



Lipides et trafic : rôles de GBF1, facteur d'échange de la petite protéine G Arf1

Samuel Bouvet

► To cite this version:

Samuel Bouvet. Lipides et trafic : rôles de GBF1, facteur d'échange de la petite protéine G Arf1. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112172 . tel-01202408

HAL Id: tel-01202408

<https://theses.hal.science/tel-01202408>

Submitted on 21 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Paris – Sud
Faculté des sciences d'Orsay

École doctorale 426
GENES, GENOMES, CELLULES



Thèse

pour l'obtention du grade de

Docteur ès sciences
de l'université Paris – Sud

présentée par

Samuel Bouvet

LIPIDES ET TRAFIC :

**Rôles de GBF1, facteur d'échange de la
petite protéine G Arf1**

Directeur de thèse : **Dr Catherine L. Jackson**
Institut Jacques Monod

CNRS, UMR 7592, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75205 Paris, France

soutenue le 20 septembre 2013

devant le jury composé de :

Dr Ludger Johannes
Dr Frédéric Pincet
Dr Sabine d'Andréa
Dr Alexis Gautreau
Dr Catherine L. Jackson

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Ces quelques lignes sont l'occasion d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à l'ensemble des personnes qui ont contribué, directement ou de plus loin, à ce travail.

Evidemment, je tiens tout particulièrement à remercier en premier lieu le Dr Catherine L. Jackson, ma directeur de thèse. Vous avez su habilement transmettre votre passion et votre enthousiasme tout en me laissant une autonomie (peut-être apparente !) qui me tenait à cœur et dont j'avais besoin.

Un grand merci ensuite aux membres de l'équipe – Alenka, Amélie, Aymen, Lucie, Lydie et Patrick – qui ont supporté mes râleries et mes énervements à cause d'un évier rempli de vaisselles sales, d'un déchet mal évacué ou d'un PC qui ne fonctionne pas ! Bref, sachez que je ne « rôle » pas, je m'exprime... Bon courage à Lydie et Aymen pour la fin de leur thèse (et oui, ce sera bientôt votre tour), et à Amélie pour ce doctorat qui commence.

Je remercie ensuite le Dr Marie-Pierre Golinelli-Cohen avec qui j'ai, par deux fois, eu l'occasion de travailler. Lors d'un stage au cours duquel tu m'as transmis une partie de ton savoir-faire et lors de ce doctorat où nous avons réussi à concrétiser le projet. Merci pour les nombreuses remises en question... Toujours nécessaires et constructives !

Merci aux jeunes et moins jeunes de l'institut Jacques Monod pour leur accueil lors de notre installation au premier étage (oui, cet étage existe !). Avec vous, j'ai eu plaisir à venir travailler (et à rester après le travail parfois). L'institut comporte de nombreuses plateformes techniques pour lesquelles, efficacité professionnelle et convivialité vont de pair.

J'ai une pensée particulière pour les personnes que j'ai rencontrées tout au long de mon parcours académique et dans les laboratoires où j'ai « usé mes fonds de culotte » pendant un été (ou plus). La liste est longue, mais chacun aura apporté sa petite pierre à l'édifice qui m'a mené au bout du doctorat. Merci pour vos conseils, vos critiques et vos encouragements.

Abordons les remerciements plus personnels. Je ne développerai pas plus mais je voudrai citer Philippe Courty. Merci. Pour tout.

Je souhaite aussi adresser une pensée à Stéphane Pouzol, tu m'as soutenu et influencé plus que tu ne le crois.

Raph, Laurie et Popo, j'espère continuer à vous côtoyer. AST un jour, amis de toujours !!

Aude L., que dire ! Après toutes ces années, tu es toujours là. Merci.

Amis Normaux, nous étions 15 au départ. À la fin de cette aventure, j'ai toujours un souvenir particulier pour cette période... À très bientôt !

Julie et Alex, Elo et Ben, Ludo et Marie, Christian, Pinou, j'espère qu'on aura à nouveau l'occasion de fêter Noël ensemble, malgré les kilomètres !

À toutes ces personnes que j'ai rencontrées et qui ont eu, ont et continuent à avoir une importance toute particulière, même si les aléas de la vie nous ont séparés.

À Fabrice, pour la correction de ce manuscrit mais aussi et surtout pour ton soutien durant cette dernière année.

Et pour finir, évidemment, une pensée à ma famille, soutient indéfectible quelque soit mon humeur et quelque soit la situation. En n'oubliant pas ceux qui sont partis trop tôt.

1	TRAFIC INTRACELLULAIRE ET MEMBRANES	3
1.1	LA CELLULE EUCARYOTE EST COMPARTIMENTEE	3
1.1.1	<i>Ultrastructure de la cellule eucaryote.....</i>	3
1.1.2	<i>Organisation du trafic intracellulaire des protéines</i>	4
1.1.3	<i>L'appareil de Golgi, organelle centrale du trafic vésiculaire.....</i>	7
1.2	FONCTIONNEMENT DU TRAFIC VESICULAIRE	9
1.2.1	<i>Les petites protéines G de la superfamille Ras</i>	10
1.2.2	<i>La formation des vésicules est contrôlée par les Arf.....</i>	12
1.2.3	<i>Le tri des vésicules est assuré par la famille Rab</i>	16
1.3	LA COORDINATION ENTRE LES PETITES PROTEINES G ASSURE LA COHERENCE DU FLUX VESICULAIRE.....	20
1.3.1	<i>Les cascades de Rab dans le trafic post-Golgi.....</i>	20
1.3.2	<i>GBF1, coordinateur de la voie sécrétoire précoce ?.....</i>	21
2	MEMBRANES ET LIPIDES.....	23
2.1	LES LIPIDES : UNE FAMILLE POLYMORPHE	23
2.1.1	<i>Les acides gras, lipides de base.....</i>	24
2.1.2	<i>Les stéroïdes, entre structure et communication.....</i>	25
2.1.3	<i>Les glycérophospholipides, lipides membranaires.....</i>	27
2.1.4	<i>Les acylglycérols, molécules de stockage de l'énergie</i>	29
2.1.5	<i>Les sphingolipides</i>	31
2.2	LES MEMBRANES BIOLOGIQUES, UNE MOSAÏQUE FLUIDE	33
2.2.1	<i>Le modèle de la bicouche lipidique</i>	33
2.2.2	<i>L'influence du paramètre de packing sur la courbure.....</i>	38
2.2.3	<i>Le recrutement des protéines périphériques.....</i>	39
2.2.4	<i>Les radeaux lipidiques, mythe ou réalité ?.....</i>	43
2.3	LE METABOLISME DES ACIDES GRAS.....	45
2.3.1	<i>La biosynthèse des acides gras</i>	45
2.3.2	<i>L'énergie des acides gras</i>	48
2.3.3	<i>Le transport intercellulaire des lipides</i>	50
2.4	INTERET SOCIOECONOMIQUE DES LIPIDES	54
2.4.1	<i>L'économie des lipides</i>	55
2.4.2	<i>Les enjeux de la filière des lipides</i>	59
3	LIPIDES ET TRAFIC INTRACELLULAIRE.....	63
3.1	LES LIPIDES, ACTEURS DU TRAFIC INTRACELLULAIRE.....	63
3.1.1	<i>Composition différenciée des membranes internes.....</i>	63
3.1.2	<i>Rôles des phosphoinositides dans le trafic vésiculaire.....</i>	66
3.2	LES GOUTTELETTES LIPIDIQUES, UNE ORGANELLE A PART ENTIERE	69
3.2.1	<i>Une structure particulière</i>	69
3.2.2	<i>Une organelle aux rôles multiples.....</i>	72
3.2.3	<i>Dynamique spatio-temporelle des gouttelettes lipidiques</i>	73
3.2.4	<i>Particularité des corps lipidiques de la cellule végétale.....</i>	74
3.3	LIPIDES, TRAFIC ET PATHOLOGIES	77
3.3.1	<i>Détournement pathologique du trafic intracellulaire</i>	77
3.3.2	<i>Les pathologies des lipides.....</i>	79
3.3.3	<i>Maladies infectieuses.....</i>	83
3.3.4	<i>Lipides et facteurs de risque.....</i>	87
4	METHODOLOGIES.....	93

4.1	CULTURE CELLULAIRE	93
4.2	FRACTIONNEMENT	93
4.3	MICROPATTERN.....	94
4.4	MICROSCOPIE.....	95
4.4.1	<i>Immunofluorescence</i>	95
4.4.2	<i>FRAP</i>	96
4.5	QUANTIFICATION AUTOUR DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES	96
4.6	PLASMIDES	98
5	MISE EN EVIDENCE D'UN DOMAINE DE LIAISON AUX LIPIDES	99
5.1	LOCALISATION ET DYNAMIQUE DE GBF1.....	99
5.1.1	<i>GBF1 est localisée sur le cis-Golgi</i>	99
5.1.2	<i>GBF1 est une protéine périphérique dynamique</i>	100
5.1.3	<i>GBF1 possède deux régions de localisation</i>	101
5.2	LE DOMAINE HDS1 EST UN DOMAINE DE LIAISON AUX LIPIDES	105
5.2.1	<i>Le domaine HDS1 est associé aux membranes des gouttelettes lipidiques</i>	105
5.2.2	<i>Une hélice amphipatique est nécessaire pour l'association du domaine HDS1 aux membranes</i> .	109
5.2.3	<i>L'hélice amphipatique est suffisante pour l'association aux gouttelettes lipidiques</i>	112
6	REGULATION DE LA LOCALISATION DE GBF1	115
6.1	LA STRUCTURE MODULAIRE DE GBF1 PERMET DE REGULER SON ACTIVITE	115
6.1.1	<i>Régulation par le domaine Sec7</i>	115
6.1.2	<i>Régulation par les domaines N-terminaux</i>	117
6.2	GBF1, UNE PLATEFORME DE COORDINATION ?	119
6.2.1	<i>L'interactome de GBF1 indique une protéine hyperconnectée</i>	119
6.2.2	<i>GBF1, l'intermédiaire entre Rab1 et Arf1 ?</i>	121
7	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	127
7.1	GBF1, COORDINATEUR DE L'HOMEOSTASIE DES LIPIDES ?	127
7.2	VERS UN CODE DES HELICES AMPHIPATIQUES ?	131
8	REFERENCES	137
9	ANNEXES	155
9.1	ARTICLE.....	155

1 Trafic intracellulaire et Membranes

1.1 La cellule eucaryote est compartimentée

1.1.1 Ultrastructure de la cellule eucaryote

La cellule eucaryote est caractérisée par la présence de membranes internes définissant des compartiments ayant chacun des fonctions et des propriétés spécifiques (Figure 1-1).

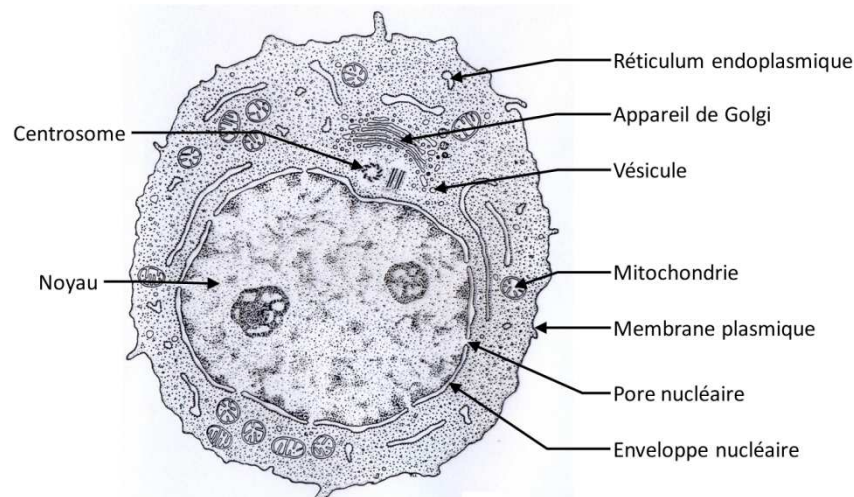


Figure 1-1 : Ultrastructure d'une cellule eucaryote animale. Le noyau est le compartiment occupant le volume le plus important. Les tubules du réticulum sont étendus dans tout le volume du cytoplasme alors que l'appareil de Golgi est concentré autour du centrosome.

Le noyau renferme les molécules d'ADN indispensables pour l'expression, la transmission et la sauvegarde du patrimoine génétique. Il est délimité par une double membrane (enveloppe nucléaire) communiquant avec le cytoplasme grâce aux pores nucléaires.

Le réticulum endoplasmique est en continuité avec l'enveloppe nucléaire. Il forme un réseau de tubules dynamiques et étendu dans le cytoplasme. Il est aussi en contact étroit avec la plupart des autres compartiments au niveau de sites de contact (MCS, *membrane contact sites*). Le réticulum est spécialisé dans les synthèses (traduction des protéines grâce aux ribosomes qui lui sont associés, synthèse des sucres et des lipides).

Les mitochondries sont des organelles à double membrane qui forment, comme le réticulum, un réseau cytoplasmique. Elles ont pour origine l'endosymbiose d'une bactérie par l'ancêtre des cellules eucaryotes. Elles en conservent les vestiges dans leur ADN circulaire codant. Les mitochondries sont

spécialisées dans la production d'énergie sous forme d'ATP grâce à la chaîne de phosphorylation oxydative insérée dans leur membrane interne.

Inversement, les saccules de l'appareil de Golgi sont, dans les cellules animales, concentrées autour du centrosome. L'appareil de Golgi est une organelle complexe dont l'organisation et le fonctionnement ne sont pas encore totalement établis. Dans les levures ou les cellules végétales, les saccules de l'appareil de Golgi sont dispersées dans le cytoplasme.

Le système endosomal permet le recyclage et le tri des protéines de la membrane plasmique. L'endosome précoce dérive de la fusion de vésicules d'endocytose. Il est ensuite mûri en endosome tardif (aussi appelé corps multivésiculaire – MVB, *multivesicular body* – en raison du bourgeonnement de vésicules intraluminales) qui finira par fusionner avec les lysosomes dont les enzymes lytiques assureront la dégradation de son contenu.

Les peroxysomes sont des petites vésicules sphériques impliquées dans la dégradation des acides gras. Ils contiennent des enzymes d'oxydation, à partir d'oxygène moléculaire, induisant la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique. Les peroxysomes ont donc aussi un rôle dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*).

Les levures et les cellules végétales contiennent une ou plusieurs vacuoles, organelles amorphes délimitées par un tonoplaste (membrane). Les vacuoles ont un rôle dans l'équilibre hydrique et la pression de turgescence dans les cellules végétales. Elles ont aussi un rôle de défense car elles permettent d'isoler des composants potentiellement toxiques pour la cellule.

Enfin, les cellules végétales possèdent des plastes, issus, comme les mitochondries, d'une endosymbiose dont ils conservent les vestiges sous la forme d'un ADN circulaire et d'une double membrane. Selon les cellules, les plastes peuvent se spécialiser dans une fonction. Ainsi, les chloroplastes qui réalisent la photosynthèse ont des structures membranaires internes (thylakoïdes) où se trouvent les pigments photosynthétiques (chlorophylle). Les chromoplastes synthétisent des pigments autres que la chlorophylle (carotènes par exemple) et sont responsables de la couleur des fruits et des fleurs. Certains plastes sont spécialisés dans l'accumulation de molécules de réserve :

- les amyloplastes contiennent des grains d'amidon,
- les oléoplastes contiennent des lipides sous forme de corps lipidiques,
- les protéoplastes contiennent des protéines sous forme de corps cristallins.

Cette compartimentalisation de la cellule permet de séparer physiquement des processus cellulaires distincts comme la synthèse protéique au niveau du réticulum endoplasmique ou la glycosylation des protéines dans l'appareil de Golgi.

1.1.2 Organisation du trafic intracellulaire des protéines

Une cellule vivante est caractérisée par des flux de matière, d'information et d'énergie entre ses différents compartiments. Les flux de macromolécules (protéines, lipides et glucides) dépendent de processus actifs, dirigés et finement régulés dont les mécanismes ne sont pas entièrement élucidés.

Les protéines sont synthétisées par les ribosomes dans le cytoplasme et assurent leur fonction dans un compartiment spécifique. L'adressage des protéines

dépend de leur séquence qui contient les informations de destination sous forme d'étiquette moléculaire. Une étiquette moléculaire peut être une séquence d'acides aminés consensus spécifiquement reconnue par des récepteurs et permettant l'adressage d'une protéine dans un compartiment donné (peptide signal). Le peptide signal peut être clivé lors de la translocation de la protéine ou être conservé. Par exemple les protéines du réticulum endoplasmique possèdent un peptide signal à l'extrémité N-terminale de la protéine qui est reconnu lors de la traduction de la protéine. La protéine est ainsi transloquée dans le réticulum endoplasmique au cours de sa traduction (Figure 1-2).

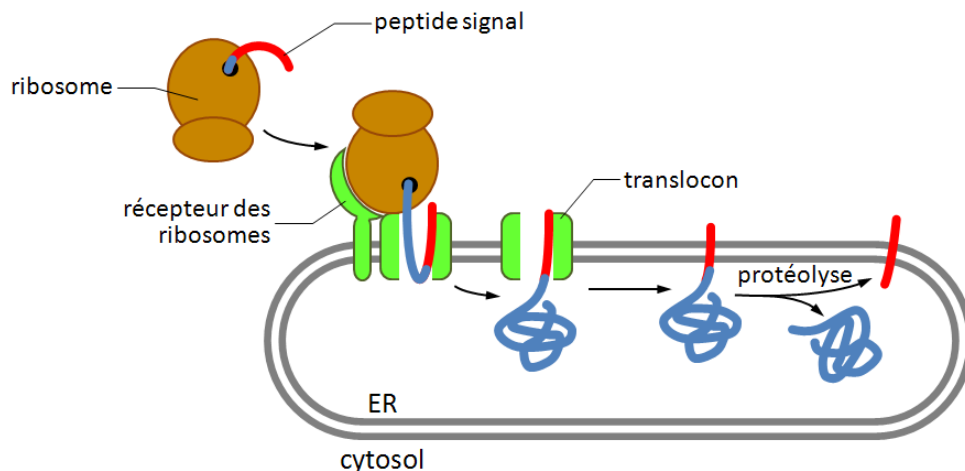


Figure 1-2 : Principe de translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique (ER). Le peptide signal se trouve à l'extrémité N-terminale de la protéine et en est donc la première partie traduite. Ce signal est reconnu par une SRP (*signal recognition particle*) qui induit une pause dans la traduction et un recrutement du complexe ribosome-ARNm-peptide sur la membrane du réticulum endoplasmique grâce à un récepteur des ribosomes et un récepteur de la SRP. La SRP est alors re-larguée, entraînant la reprise de la traduction et le transport cotraductionnel de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Le peptide signal peut être conservé, sous la forme d'un domaine transmembranaire ou être clivé ce qui permet de libérer une protéine soluble dans la lumière du réticulum endoplasmique.

Le transport transmembranaire (Figure 1-3) correspond à la translocation de protéines à travers la membrane du compartiment après leur traduction grâce à l'activité de translocons (protéines transmembranaires). Les protéines mitochondriales et chloroplastiques codées par le génome cellulaire sont adressées de cette façon. De même, il existe un signal de translocation pour les enzymes peroxysomales (PTS1 et PTS2) [1].

Les protéines nucléaires sont transloquées dans le noyau à travers les pores nucléaires (Figure 1-3). Les pores nucléaires sont des assemblages supramoléculaires insérés dans l'enveloppe nucléaire qui assurent le contrôle des flux entrants et sortants de protéines (facteurs de transcription, polymérases, histones, etc.) et d'acides aminés (ARN principalement). Le NLS (*nuclear localisation sequence*) permet à une protéine d'être transloquée dans le noyau. Inversement, le NES (*nuclear export sequence*) est un signal d'export. L'import et l'export nucléaire sont des processus finement régulés.

Enfin, les protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique peuvent être insérées co-traductionnellement dans la membrane ou sécrétées dans la lumière du réticulum (Figure 1-2). Leur devenir dépend de la présence ou de l'absence

d'étiquette moléculaire. Une fois traduite dans le réticulum, les protéines sont transportées vers le Golgi dans des intermédiaires de transport délimités par une membrane (les vésicules).

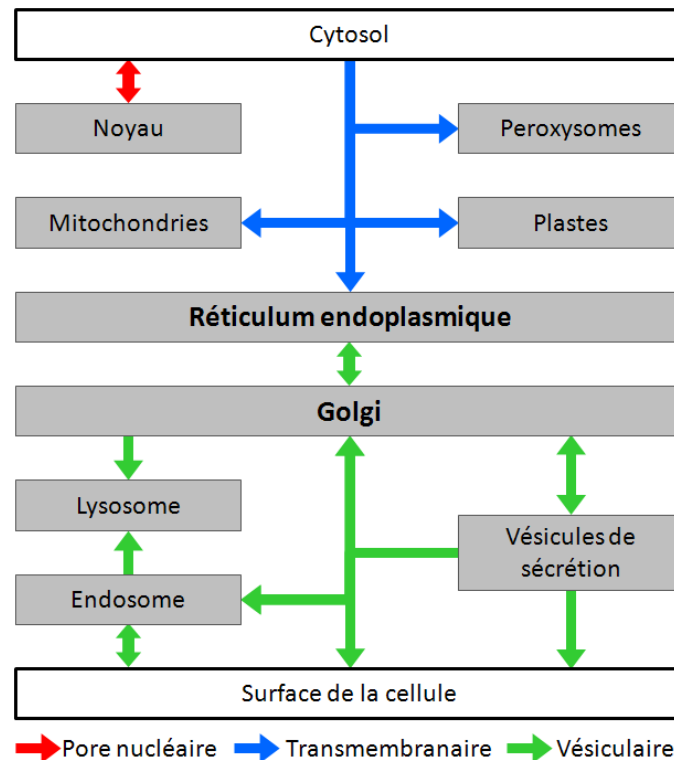


Figure 1-3 : Schéma des voies de trafic des protéines dans la cellule. Les protéines peuvent se déplacer d'un compartiment à un autre par un transport transmembranaire (flèche bleues et cas particulier des pores nucléaires, flèche rouge) ou vésiculaire (flèches vertes).

Le transport vésiculaire peut être schématisé en trois flux selon leur directionalité (Figure 1-4) :

- le flux antérograde, du réticulum vers la membrane plasmique permet l'adressage des protéines à la membrane ou de sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire (voie sécrétoire),
- le flux rétrograde, permet de recycler les membranes au sein du Golgi et du Golgi vers le réticulum endoplasmique,
- la voie endocytaire, permet d'absorber des composants du milieu extracellulaire.

Le trafic vésiculaire entre le réticulum et le Golgi est la première étape de tri des protéines nouvellement synthétisées dans le réticulum. Les protéines sortent du réticulum au niveau des ERES (*ER Exit Site*) dans des vésicules COPII. La fusion homotypique des vésicules permet de former un compartiment intermédiaire (ERGIC, *ER-Golgi intermediate compartment*) dont la maturation engendrera le Golgi.

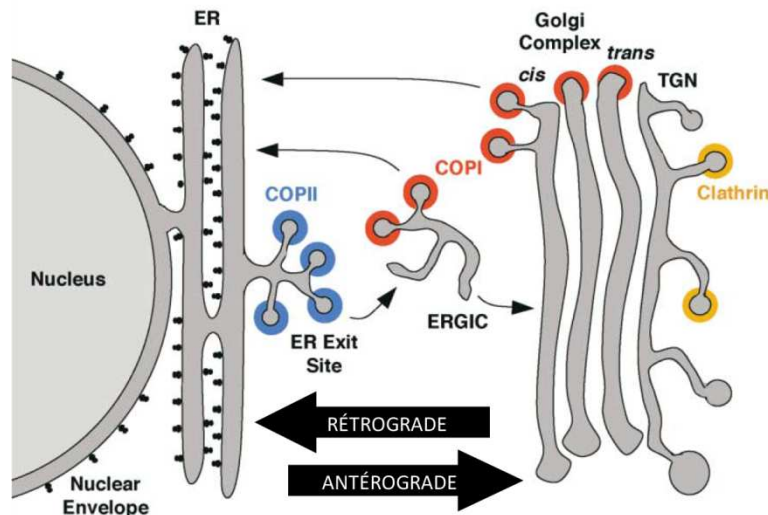


Figure 1-4 : Schéma de l'organisation du trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique (ER) et le Golgi (modifié d'après [2]). Les étapes sont indiquées par des flèches et les couleurs indiquent les sites de recrutement du manteau COPII (bleu), COPI (rouge) et clathrine (jaune).

1.1.3 L'appareil de Golgi, organelle centrale du trafic vésiculaire

Le Golgi, une organisation dynamique

L'appareil de Golgi a été décrit pour la première fois en 1898 par Camillo Golgi, neurobiologiste et médecin italien (1843-1926). Il s'agit d'un appareil intracellulaire réticulé (*apparato reticolare*), d'abord identifié dans les cellules de Purkinje et ensuite mis en évidence dans tous les types cellulaires (Figure 1-5). Il a cependant fallu attendre la fin des années 50 pour que l'existence de l'appareil de Golgi soit universellement admise, grâce à la microscopie électronique qui permet d'observer directement les structures intracellulaires [3], [4].

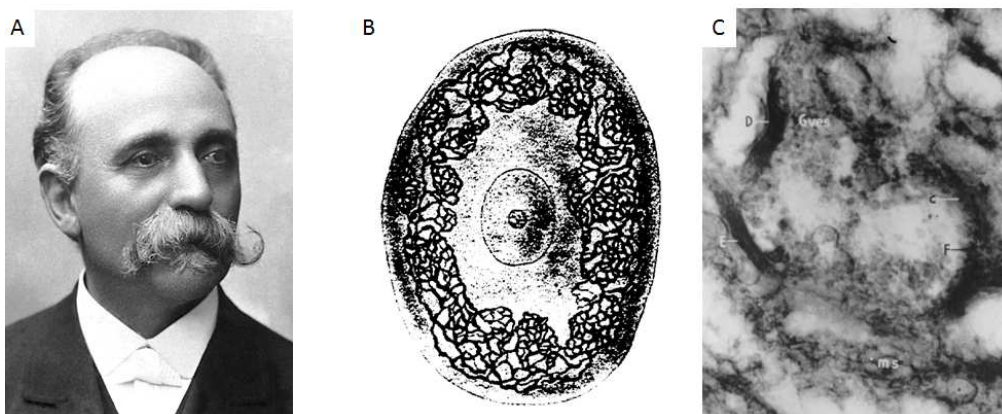


Figure 1-5 : Historique de la mise en évidence de l'appareil de Golgi. (A) Camillo Golgi (1843-1926), prix Nobel 1906 de médecine et biologie, est le premier à avoir décrit une structure interne formant un réseau dans une région périnucléaire; (B) Illustration de l'appareil réticulaire endocellulaire (*endo-cellular reticular apparatus*) parue en 1898 dans « *Intorno alla struttura delle cellule nervose. Bollettino della Societa medico-chirurgica di Pavia. 13:1-14; (1898)* ». Image extraite du discours de C.Golgi lors de la remise du prix Nobel (www.nobelprize.org) ; (C) Image de microscopie électronique montrant les saccules de l'appareil de Golgi. Images de Lacy, D. J. *Biophys. Biochem. Cytol.* 3:779- 796; (1957) reproduites dans [3] à l'occasion du centième anniversaire de la découverte du Golgi.

L'appareil de Golgi est une organelle organisée en saccules (ou dictyosomes) empilés. Nous pouvons distinguer le *cis*, le *medial* et le *trans* Golgi (Figure 1-6). Chaque saccule contient des enzymes spécifiques réalisant les modifications successives des protéines. L'appareil de Golgi est aussi le siège de la synthèse de certains lipides.

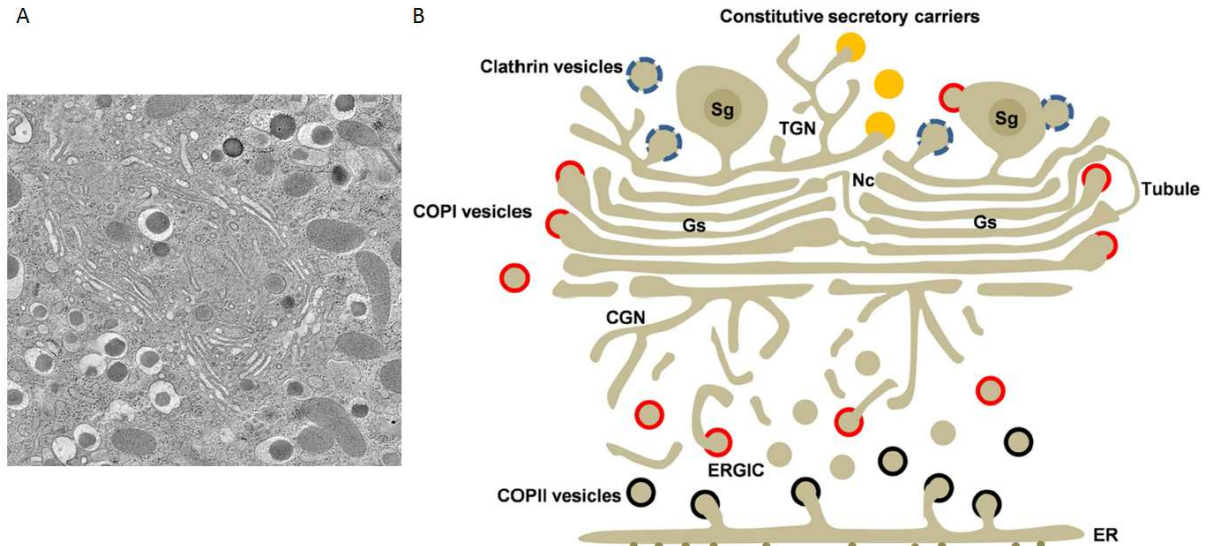


Figure 1-6 : Structure de l'appareil de Golgi. (A) image de tomographie électronique d'une cellule β pancréatique murine [5] ; (B) schéma de l'appareil de Golgi et organisation des intermédiaires de transport de la voie de sécrétion [6]. ER : réticulum endoplasmique ; ERGIC : compartiment intermédiaire entre le ER et le Golgi ; CGN : *cis*-Golgi network ; Gs : saccules du Golgi ; Nc : régions non compactes du Golgi ; TGN : *trans*-Golgi network ; Sg : vésicule de sécrétion.

Dans les cellules animales, les saccules sont regroupés au centre de la cellule, autour du centre organisateur des microtubules. Ainsi, un traitement qui dépolymérise des microtubules induit une fragmentation de l'appareil de Golgi. Inversement, dans les cellules végétales ou dans les levures, l'appareil de Golgi est fragmenté en plusieurs *stacks* dispersés dans la cellule et autonomes.

Les protéines et les lipides qui traversent le Golgi subissent des modifications post-traductionnelles successives, en particulier des glycosylations. Ces glycosylations ont une importance capitale pour l'intégrité des organelles et le bon fonctionnement de la cellule. Des mutations affectant les voies de glycosylation intra-golgiennes ont des phénotypes léthaux chez plusieurs organismes [7–9]. Les glycosyl-transférases sont maintenues dans le Golgi grâce à leur segment transmembranaire et des signaux intra-luminaux de rétention [10].

Le modèle de maturation du Golgi

Le maintien de l'architecture complexe et de l'identité des saccules du Golgi, malgré des flux constant (rétrograde et antérogrades) de protéines et de lipides, est l'une des questions non résolues par les biologistes cellulaires.

Plusieurs modèles ont été proposés, chacun avec des observations contradictoires [11]. Le modèle consensus est aujourd'hui celui de la maturation-progression des saccules [12], [13]. Ce modèle implique que les protéines qui traversent le Golgi (les *cargos*) sont maintenues dans les saccules qui se déplacent au sein du Golgi. Les saccules ont une identité stable et organisée, en terme de

composition lipidique et protéique [14]. Or lors de la progression des saccules au sein du Golgi, les enzymes du *cis*-Golgi se retrouvent dans le *medial*-Golgi. Afin de conserver l'identité des saccules, les enzymes sont triées et transportées de façon rétrograde vers le saccule précédent par des vésicules COPI. Cette maturation du Golgi a été directement observée dans la levure par vidéomicroscopie [15].

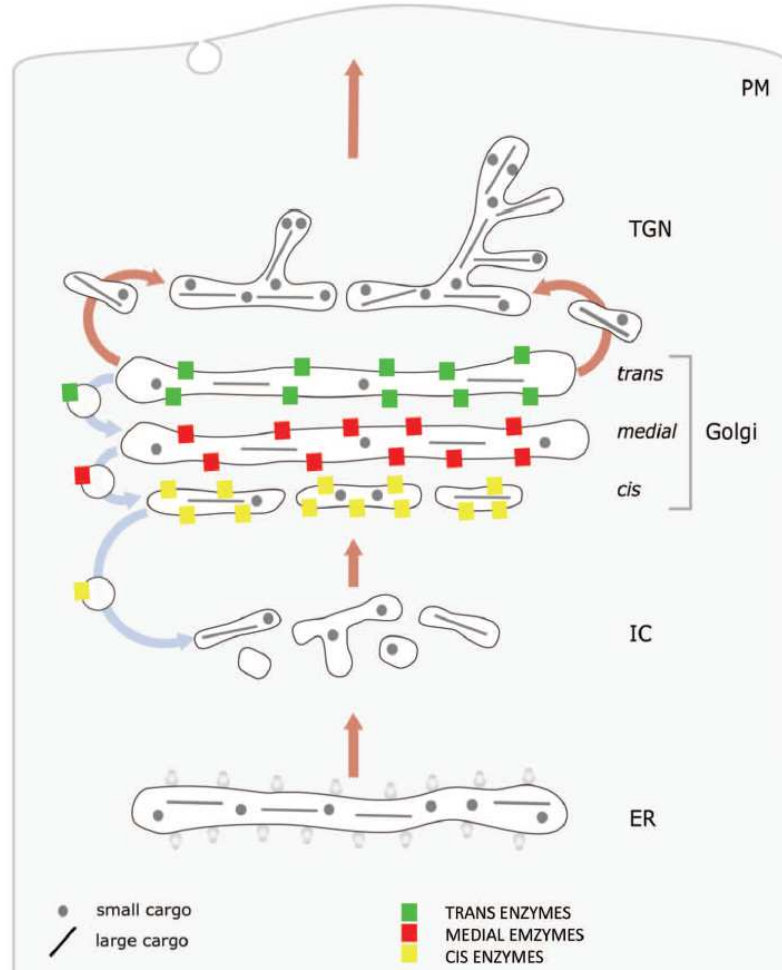


Figure 1-7 : Modèle de maturation du Golgi (*modified cisternal progression-maturation*) [11]. Dans le modèle de maturation du Golgi, les cargos restent dans les saccules qui progressent du *cis*-Golgi vers le *trans*-Golgi. Les enzymes sont recyclées dans des vésicules COPI permettant de progressivement modifier l'identité des saccules. Le passage du *trans*-Golgi au TGN est réalisé par des vésicules et suit une cinétique non linéaire en raison du tri réalisé au niveau du TGN [14]. ER : réticulum endoplasmique ; IC : compartiment intermédiaire (ERGIC) ; TGN : trans-Golgi network ; PM : membrane plasmique.

1.2 Fonctionnement du trafic vésiculaire

La formation de vésicules est un mécanisme cellulaire commun à toutes les cellules eucaryotes. Les vésicules bourgeonnent d'un compartiment donneur (destinateur), puis fissionnent pour former des vésicules libres qui se déplacent le long du cytosquelette. La vésicule est ensuite adressée à un compartiment accepteur (destinataire) avec lequel elle fusionne pour libérer son contenu dans la lumière du destinataire (Figure 1-9). Il existe trois principaux types de vésicules,

classées selon le type de protéine qui compose le manteau : COPI, COPII et clathrine. Le manteau est une couche protéique entourant la vésicule formée par la polymérisation réversible d'unités protéiques (*coatomers*). Les vésicules COPII assurent le transport antérograde entre le réticulum endoplasmique et le Golgi. Les vésicules COPI réalisent les transports rétrogrades au sein de l'appareil de Golgi et du Golgi vers le réticulum endoplasmique. Enfin, les vésicules recouvertes de clathrine sont impliquées dans les processus endocytiques (transport rétrograde de la membrane plasmique vers les endosomes et le Golgi).

1.2.1 Les petite protéines G de la superfamille Ras

Le trafic des vésicules est contrôlé par des petites protéines G de la superfamille Ras. Les petites protéines G sont des GTPases qui existent sous deux conformations et agissent comme des interrupteurs moléculaires permettant de contrôler l'organisation et la signalisation intracellulaire [16]. Les petites protéines G de la superfamille Ras partagent la même structure du site de fixation du GTP malgré une grande diversité de séquence (le séquençage du génome humain a permis de mettre en évidence 151 séquences uniques de petites protéines G de la superfamille Ras). Ainsi, les petites protéines G de la superfamille Ras peuvent être regroupées dans cinq familles [16] :

- la famille Ras, impliquée dans la transduction du message,
- la famille Rho, impliquée dans les voies de signalisation intracellulaire,
- la famille Ran, impliquée dans le transport nucléaire (il n'existe qu'un membre de la famille Ran chez l'Homme),
- la famille Arf (cf. 1.2.2 ci-dessous),
- la famille Rab (cf. 1.2.3 ci-dessous).

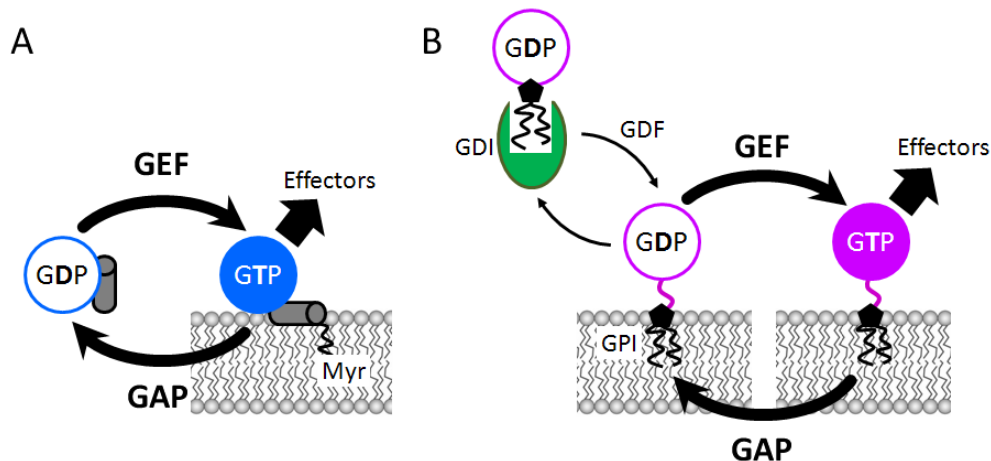


Figure 1-8 : Cycle d'activation et de désactivation des petites protéines G Arf (A) et Rab (B). (A) Cycle d'activation des petites protéines G de la famille Arf. Myr : myristoylation d'une hélice C-terminale, exposée suite à un changement de conformation lors de l'échange du GDP en GTP ; (B) Cycle d'activation des petites protéines G de la famille Rab. Les Rab sont associées à la membrane par géranylgéranyle (Ger) de deux cystéines C-terminales. Les Rab sont maintenues en solution par une GDI (*GDP dissociation inhibitor*) qui masque le géranylgéranyle. Le GDI est libéré lors de l'action d'une GDF (*GDI displacement factor*) permettant d'exposer le géranylgéranyle. GEF : facteur d'échange du nucléotide guanique (*Guanine nucleotide exchange factor*). GAP : facteur d'activation de l'activité GTPasique (*GTPase activating protein*). [17]

Toutes les petites protéines G ont un mode d'action similaire (Figure 1-8). Brièvement, les petites protéines G inactives (liées au GDP) sont activées par le facteur d'échange de guanine (GEF) qui catalyse le re-largage du GDP. L'échange de nucléotide guanidique induit un changement de conformation de la petite protéine G permettant son ancrage stable à la membrane. Puis la petite protéine G activée recrute ses différents effecteurs (protéine du manteau, enzyme de modification lipidique, moteur moléculaire, facteur d'attachement, facteur de fusion). Un effecteur est, par définition, une protéine se liant de façon préférentielle à la forme active de la petite protéine G (liée au GTP). Les protéines d'activation de la GTPase (GAP) accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP pour inactiver la protéine G.

Les familles Rab et Arf sont toutes deux impliquées dans le contrôle du trafic vésiculaire. Schématiquement, les membres de la famille Arf contrôlent les étapes précoces (bourgeonnement et fission) de la formation des vésicules. Inversement, les étapes tardives (déplacement, adressage, fusion) sont contrôlées par les membres de la famille Rab (Figure 1-9).

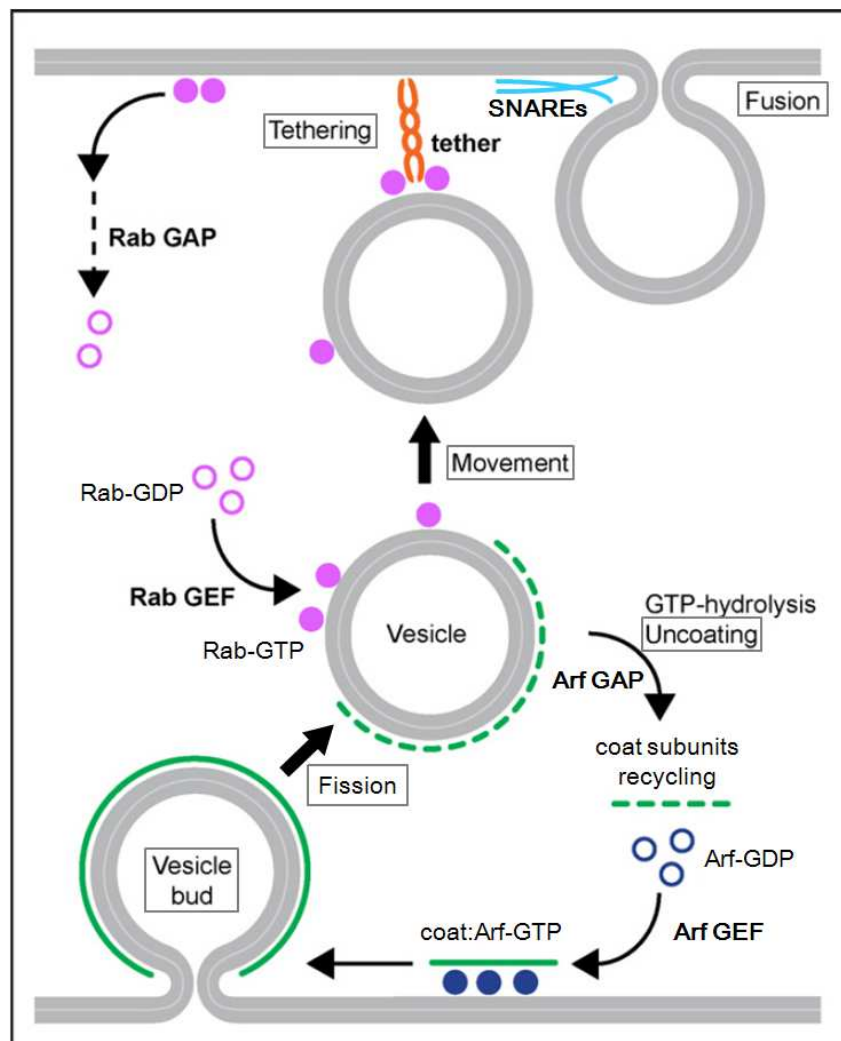


Figure 1-9 : Schéma des principales étapes du trafic vésiculaire entre un compartiment donneur (bas) et un compartiment accepteur (haut). Modifié d'après [18].

1.2.2 La formation des vésicules est contrôlée par les Arf

La famille Arf

La famille Arf est composée de trois groupes [19] ; Arf, Arl (Arf-like) et Sar. Il existe cinq représentants de la famille Arf chez l'Homme qui peuvent être regroupés en trois classes par homologies de séquences (Figure 1-10) [20–22] :

- La classe I comprend Arf1 et Arf3 qui assurent le contrôle du trafic vésiculaire de et vers le Golgi ;
- La classe II comprend Arf4 et Arf5 dont la fonction est peu connue. Elles sembleraient avoir en partie un rôle redondant avec les Arf de classe I. Cependant, les Arf de classe II ont une dynamique différente de celles des Arf de classe I [21], [23] ;
- La classe III comprend un seul membre, Arf6, localisé à la membrane plasmique et sur les endosomes. Arf6 est impliquée dans l'homéostasie du cholestérol, le tri et le trafic des endosomes ainsi que l'adhésion et la motilité cellulaire [24], [25].

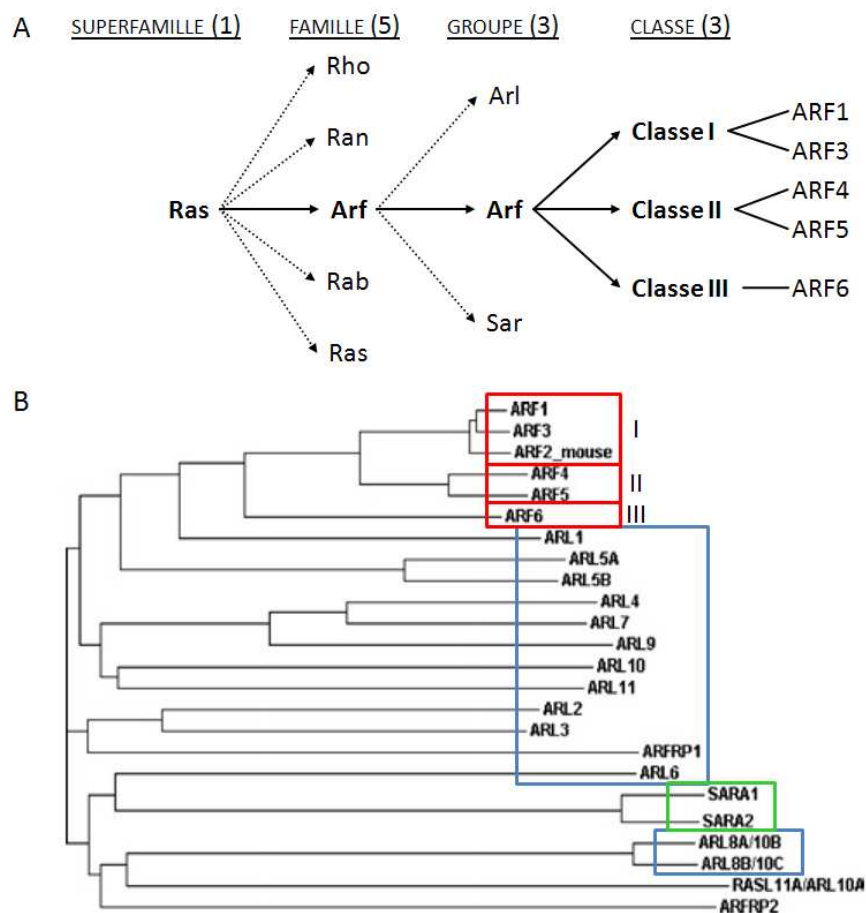


Figure 1-10 : Classement des protéines Arf humaines. (A) Les cinq protéines Arf exprimées chez l'Homme appartiennent au groupe des Arf, à la famille Arf et à la superfamille Ras. La protéine Arf2 a été perdue chez l'Homme mais est exprimée dans d'autres espèces. C'est une Arf de classe II [21] ; (B) Arbre phylogénétique des 21 membres de la famille des Arf humaines. Les Arf sont regroupées en 3 groupes : les Arf (rouge), les Arl (bleu) et les Sar (vert) (modifié d'après [26]).

Les Arf ont la particularité de posséder une hélice amphipatique de 17 résidus en N-terminal de la protéine. Cette hélice est myristoylée sur la glycine 2 permettant l'ancrage de la protéine dans les membranes (Figure 1-8 A). Dans sa conformation liée au GDP, l'hélice est tournée vers le centre de la protéine (Figure 1-11). Lors du changement de conformation lié à la fixation du GTP, l'hélice est découverte, ce qui permet l'insertion de résidus hydrophobes dans la membrane (Figure 1-11) [19], [27], [28].

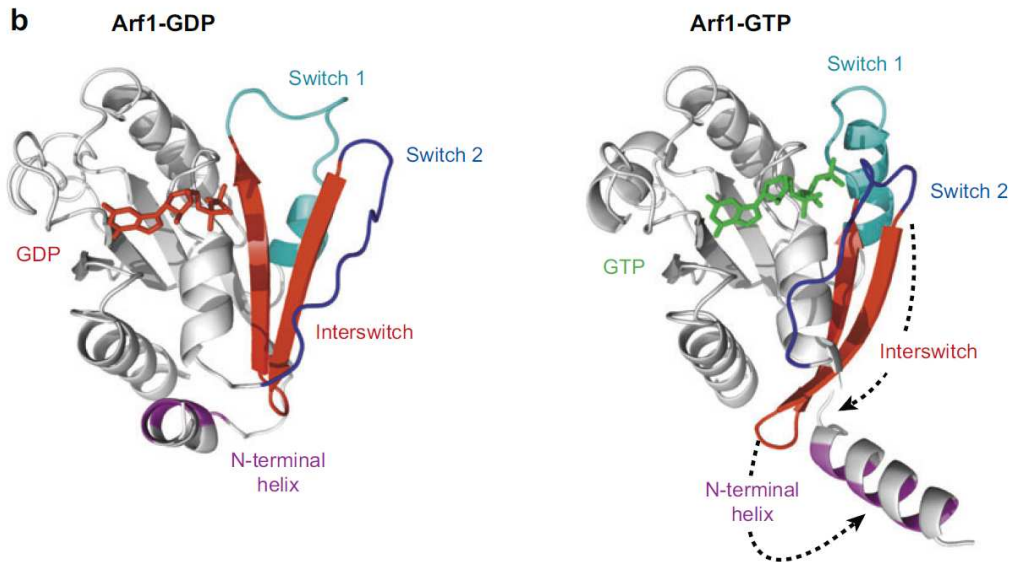


Figure 1-11 : Structure de Arf1-GDP (à gauche) et Arf1-GTP (à droite) montrant les changements de conformation qui interviennent dans le cycle GDP/GTP [29]. Les *switch* (en vert et en bleu) sont les régions dont le changement de conformation est directement lié à la fixation du nucléotide. Le rapprochement des deux régions *switch* induit un déplacement de la région *interswitch* (en rouge) qui entraîne le dégagement de l'hélice N-terminale et l'exposition des résidus hydrophobes (en mauve).

Les Arf sont activées par l'échange du GDP par un GTP, catalysé par une GEF (Figure 1-8). Les Arf-GEF forment un groupe hétérogène partageant le même domaine catalytique : le domaine Sec7 [30], [31]. Les Arf-GEF peuvent être regroupées en cinq familles selon l'organisation des domaines non catalytiques de la protéine (Figure 1-12). Les familles des Cytohesin, des EFA6 et BRAG sont des petites protéines (<100 kDa) possédant un domaine PH en aval du domaine Sec7. Les cytohesines sont localisés à la membrane plasmique grâce à leur domaine PH qui possède une affinité pour le $\text{PtIns}(3,4,5)\text{P}_3$ et le $\text{PtIns}(4,5)\text{P}_2$ [32]. De même, le domaine PH des BRAG a une spécificité pour le $\text{PtIns}(4,5)\text{P}_2$ leur permettant d'être recruté sur la membrane plasmique [33].

Le grand nombre de facteurs d'échange (15) par rapport au nombre restreint d'Arf (5) implique une régulation fine. Cependant, à l'exception des EFA6 qui, *in vitro*, montrent une spécificité pour Arf6 [34], les autres GEF ont, *in vitro*, un manque de spécificité pour l'une des classes. Par exemple, ARNO peut activer Arf1 et Arf6 *in vitro* [35]. La spécificité de l'activation des Arf repose sur une régulation de la localisation subcellulaire précise des GEF, rendue possible par les domaines non catalytiques en N-terminal et en C-terminal du domaine Sec7.

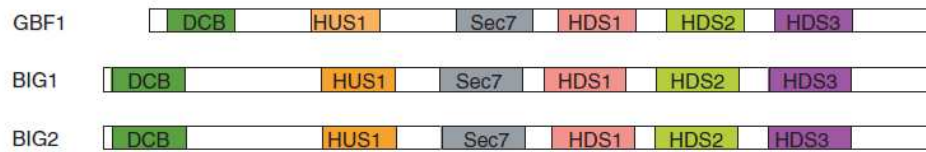
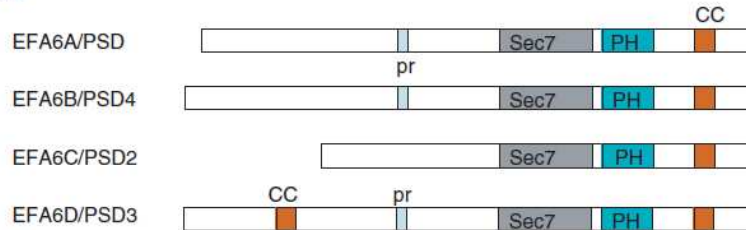
GBF/BIG*Cytohesins**EFA6**BRAGs**Fbox*

Figure 1-12 : Organisation des domaines des Arf-GEF contenant le domaine Sec7 [31]. DCB : dimerisation and cyclophilin-binding ; HUS : homology upstream of Sec7 ; HDS : homology downstream of Sec7 ; PH : pleckstrin homology domain ; pr : proline rich domain ; CC : coiled-coil ; IQ : domaine IQ de liaison à la calmoduline ; Fbox : domaine d'interaction à l'ubiquitine ligase.

GBF1, l'un des grands GEF des Arf

Au début des années 1990, la bréfeldine A (BFA) fut largement utilisée pour étudier le trafic membranaire. Le traitement par la BFA induit un défaut de sécrétion dans les cellules de mammifères [36], [37] et dans la levure [38]. Au niveau moléculaire, il a rapidement été mis en évidence que la BFA inhibait l'échange nucléotidique de la petite protéine G Arf1 [39]. Notre laboratoire a montré que la BFA est un inhibiteur non compétitif des grands GEF qui possède un mode d'action inédit : la BFA stabilise un complexe inactif entre le domaine Sec7 et Arf1(GDP) [40].

Les grands GEF des Arf forment une famille pouvant être séparée en deux groupes : d'un côté les membres de la famille GBF/Gea et de l'autre la famille

BIG/Sec7. Ces deux groupes partagent la même structure (Figure 1-12) et sont tous deux impliqués dans le contrôle du trafic vésiculaire de et vers le Golgi en activant les Arf de classe I ou de classe II. Dans les cellules de mammifères, GBF1 (*Golgi specific BFA resistance guanine exchange factor 1* – le seul membre de la famille GBF/Gea chez l'Homme) est majoritairement localisé au niveau du *cis*-Golgi [41–43] alors que BIG1 et BIG2 sont localisés sur le *trans*-Golgi et le TGN.

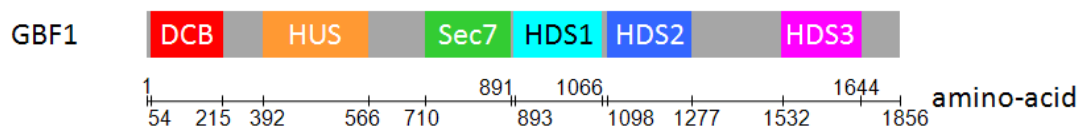


Figure 1-13: Architecture de GBF1 (modifié d'après [44])

GBF1 possède cinq domaines non catalytiques dont les fonctions sont encore peu connues. Ils peuvent avoir un rôle régulateur sur l'activité ou le recrutement de GBF1 ou conférer à GBF1 des fonctions supplémentaires. Ainsi, les domaines DCB et HUS en N-terminal de GBF1 (Figure 1-13) sont impliqués dans la dimérisation de la protéine [45]. Les domaines HDS possèderaient de nombreuses hélices alpha et se fixeraient sur les gouttelettes lipidiques [46]. GBF1 interagit avec plusieurs partenaires cellulaires dont la protéine d'arrimage p115 [43], la lipase ATGL (*adipocytes triglycerids lipase*) [46], la sous-unité γ COP de COPI [47] et la petite protéine G Rab1 [48]. L'activation de la petite protéine G Arf1 par GBF1 permet le recrutement, entre autres, de la protéine de manteau COPI et la phosphatidylinositol 4-kinase III β (PI4KIII β) [49], [50].

De récents travaux ont montré des rôles non-conventionnels de GBF1. Notre équipe a montré un rôle de GBF1 dans la localisation d'ATGL et PLIN2 (ADRP, *adipophilin differentiation related protein*) sur les gouttelettes lipidiques [51]. GBF1 pourrait aussi avoir un rôle au niveau de la membrane plasmique dans l'internalisation des protéines à ancre GPI (voie GEEC) [52]. Enfin, GBF1 est aussi requis pour la réplication ou la production de certains virus dont le Cocksackievirus B3 [53], le Poliovirus [53], [54], le Coronavirus de l'hépatite murine [55] et le virus de l'hépatite C [56].

La présence de nombreux domaines, en plus du domaine catalytique, suggèrent que GBF1 :

- pourrait être soumis à une régulation conformationnelle de son activité ou de sa localisation,
- pourrait avoir une fonction indépendante de son activité GEF dans le contrôle du trafic vésiculaire entre le Golgi et le réticulum endoplasmique,
- pourrait servir de base à un complexe multiprotéique permettant de mettre en place et de connecter les acteurs du trafic entre le réticulum endoplasmique et le Golgi.

Les mécanismes de localisation de GBF1 et leurs régulations ne sont pas encore élucidés.

Les Arf de classe I et II contrôlent les étapes précoces du trafic vésiculaire au Golgi

Les Arf de classe I et II sont localisées sur les membranes de la voie sécrétoire précoce (ERGIC et *cis*-Golgi) ainsi que sur le *trans*-Golgi et le TGN [21], [23], [57]. Arf1 est le plus abondant et le mieux étudié des représentants des Arf.

Une fois activée par une GEF de la famille Sec7, Arf1 recrute de nombreux effecteurs (Tableau 1-1) comme les manteaux (COPI, les adaptateurs AP1,3,4 et GGA1,2,3), des protéines de reconnaissance des lipides (FAPP1,2), des enzymes de modification des lipides (PI4K, PI4P5K, PLD), des enzymes de transfert de lipide (CERT) ou le facteur d'attachement GMAP210.

Tableau 1-1 : Effecteurs de Arf1.

Effecteur		Réf.
Manteau		
COPI	coatomer protein I	[47], [58]
AP1	adaptor protein 1	[59–61]
GGA1,2,3	Golgi-localized, gamma ear containing, ADP ribosylation factor binding protein	[62], [63]
AP3	adaptor protein 3	[59], [64]
AP4	adaptor protein 4	[65]
Enzyme de modification des lipides		
FAPP1,2	four-phosphate-adaptor protein	[66–68]
CERT	ceramide transfer protein	[66], [69]
PI4K	Ptlns-4 kinase	[70]
PI4P5K	Ptlns(4)P-5 kinase	[71–73]
PLD	phospholipase D	[72], [74], [75]
Facteur d'attachement		
GMAP210	Golgi-associated microtubule binding protein 210	[76], [77]

NB : ne sont listés qu'une partie des effecteurs

1.2.3 Le tri des vésicules est assuré par la famille Rab

La famille Rab

Il existe 66 Rab identifiées chez l'homme et 12 homologues chez la levure [78], [79]. Grâce aux données de séquençage, plus de 8 000 séquences de protéines Rab ont été analysés ce qui a permis de les regrouper en une quarantaine de sous-familles [80]. Comme les autres Ras, les Rab ont une structure commune de cœur fixant le nucléotide guanidique. La variabilité des Rab réside dans l'extrémité C-terminale dont les cystéines (-CC, -CXC, -CCXX, ou -CXXX) sont reconnues par une GGTase (géranylgéranyl transférase) qui catalyse le transfert d'un géranylgéranyl sur une ou deux cystéines [81]. Contrairement aux Arf, les Rab ne

possèdent pas de domaine protéique de liaison aux membranes et leur association repose uniquement sur l'insertion des groupements géranylgéranyl.

Les compartiments cellulaires sont discriminés par les Rab

Une question fondamentale dans le trafic vésiculaire est l'identification moléculaire des vésicules et de leur contenu. Pour cela, les Rab forment une large famille multigénique [80] permettant d'identifier les différents compartiments cellulaires (Figure 1-14). Ainsi, Rab6A est spécifique du *trans*-Golgi et Rab1 est spécifique du *cis*-Golgi [82–84].

Les inhibiteurs de la dissociation du GDP (GDI, *GDP dissociation inhibitor*) (Figure 1-8) ont une spécificité pour une Rab sous sa forme liée au GDP et possèdent une poche hydrophobe permettant d'accommoder l'ancre géranylgéranyl. Les GDI sont capables d'extraire une Rab des membranes pour assurer leur recyclage [82], [85]. Cependant les GDI, comme les facteur de déplacement du GDI (GDF), n'ont pas de spécificité pour une Rab [86], ce qui implique la participation d'autres facteurs pour expliquer la spécificité du compartiment. La spécificité des Rab pour un compartiment membranaire est apportée en partie par le facteur d'échange (GEF). Les Rab sont spécifiquement activées par une GEF. Le GEF est une protéine associée à la membrane du compartiment sur laquelle la Rab doit être recrutée. La variabilité des GEF est aussi un facteur de spécificité [87], [88].

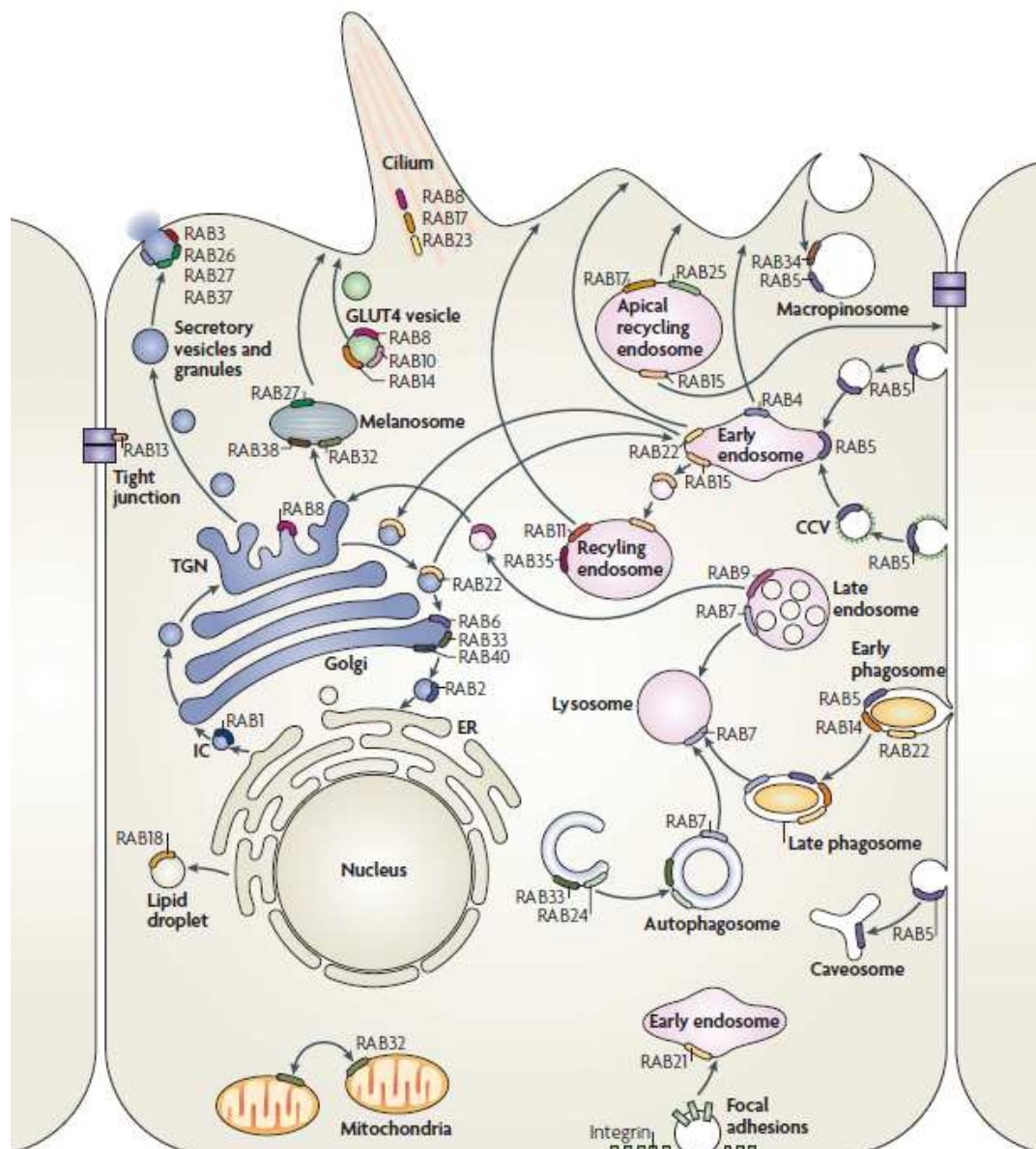


Figure 1-14 : Les Rab permettent d'identifier les différents compartiments cellulaires [82].

Enfin, les Rab et leurs effecteurs définissent des microdomaines membranaires. Ainsi Rab9 et Rab7 sont localisées sur des domaines distincts des endosomes tardifs. Les microdomaines ainsi définis permettent de recruter des effecteurs de façon différentielle, à l'origine du tri lipido-protéique réalisé par le trafic vésiculaire.

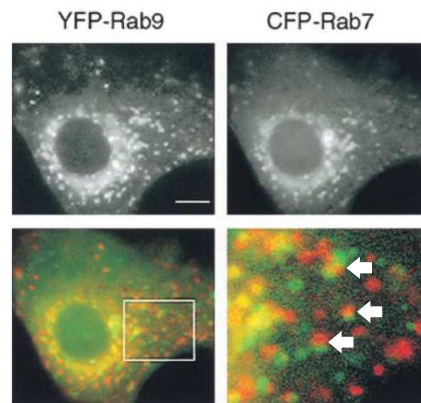


Figure 1-15 : Rab9 et Rab7 sont localisées sur des domaines distincts sur les endosomes tardifs [89]. La surexpression d'YFP-Rab9 (en rouge) et de CFP-Rab7 (en vert) permet de mettre en évidence des domaines où les deux Rab ne colocalisent pas sur le même endosome (indiqué par les flèches blanches sur l'agrandissement). (Barre d'échelle = 10 μ m).

Les Rab contrôlent les étapes finales du trafic vésiculaire

Les effecteurs des Rab sont principalement impliqués dans le déplacement des vésicules (moteurs moléculaires), dans l'adressage des vésicules (facteurs d'attachement) et dans la fusion avec le compartiment accepteur (SNARE).

Rab6 est localisée au niveau du TGN et du *trans*-Golgi et est impliquée dans le transport rétrograde des endosomes vers le Golgi et du Golgi vers le réticulum (trafic rétrograde indépendant de COPI) [90]. Rab6 possède deux isoformes (Rab6A et Rab6A') résultant d'un épissage alternatif d'un exon dupliqué. Ces deux isoformes semblent avoir des fonctions chevauchantes mais non entièrement redondantes [91]. Rab6 intervient dans le recrutement de plusieurs moteurs sur le Golgi dont la dynéine [92], Rabkinésine-6 [90], [93] et la myosine [94].

Il existe deux catégories de facteurs d'attachement (*tether*) permettant l'adressage des vésicules : les longs *coiled-coil* (p115, GM130) et les complexes multiprotéiques (TRAPPI, TRAPPII). Par exemple, l'interaction entre p115 et GM130 permet de cibler les vésicules issues du réticulum endoplasmique vers le Golgi [95]. Ces deux facteurs sont recrutés par la petite protéine G Rab1 [96–98] qui existe sous deux isoformes (Rab1A et Rab1B). Rab1 contrôle le trafic antérograde entre le réticulum endoplasmique et le Golgi [99].

Enfin, la fusion de la vésicule avec la membrane du compartiment accepteur est réalisée par les SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*). L'interaction entre une SNARE associée à la membrane de la vésicule (v-SNARE) et des SNARE associées à la membrane du compartiment destinataire (t-SNARE) favorise le rapprochement des membranes conduisant à la formation d'une hémifusion puis à la fusion complète de la vésicule. L'attachement de la vésicule sur la membrane du compartiment accepteur précède l'association des SNARE. La régulation des SNARE par les Rab repose souvent sur une interaction indirecte entre la Rab et les SNARE [100].

1.3 La coordination entre les petites protéines G assure la cohérence du flux vésiculaire

La cohérence du trafic vésiculaire repose sur deux principes. D'une part, les vésicules doivent être adressées vers le bon compartiment, d'autre part le flux doit être correctement dirigé (rétrograde ou antérograde). Ainsi, une protéine extracellulaire est synthétisée dans la lumière du réticulum endoplasmique, puis est glycosylée dans l'appareil de Golgi avant d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire. Comprendre comment ces étapes sont séquentiellement régulées est l'une des nombreuses questions non résolues en biologie cellulaire. L'une des explications prend la forme d'une *cascade* entre les protéines G (Figure 1-16).

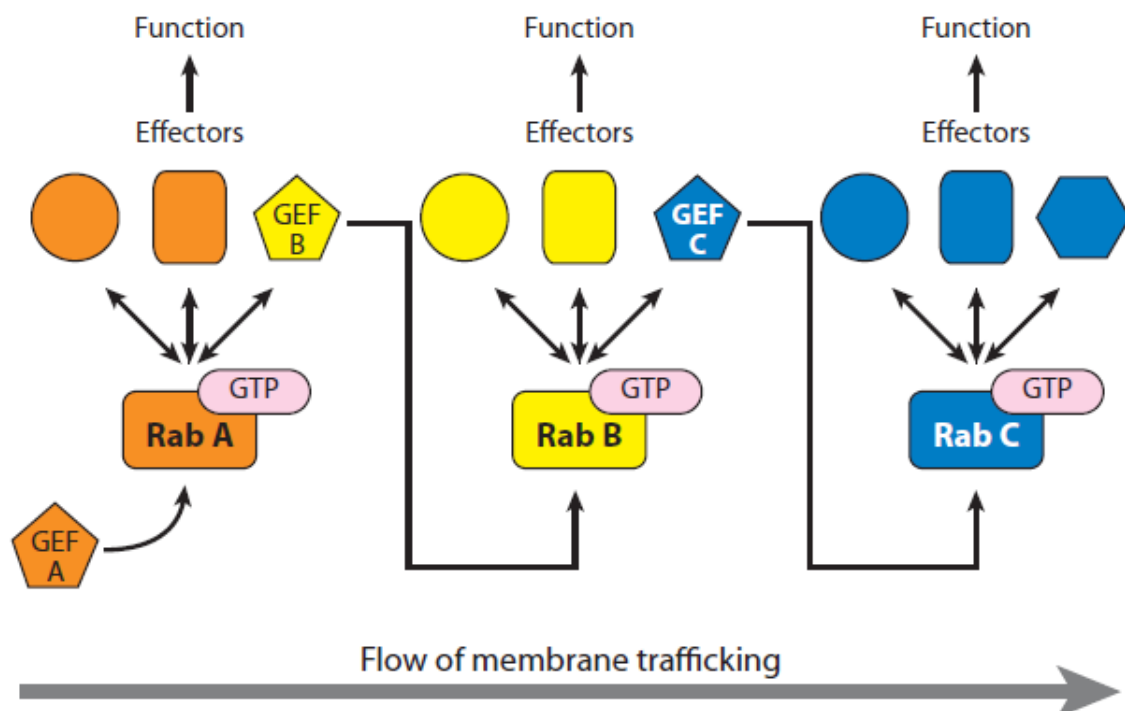


Figure 1-16 : Principe du fonctionnement des cascades de Rab [101]. La première Rab A est activée par son facteur d'échange (GEF A). Parmi les effecteurs de cette Rab figure le GEF B de la Rab B. Le recrutement de cette GEF permet d'activer la Rab B qui à son tour recrute le GEF C de la Rab C. Chaque Rab recrute un panel d'effecteurs spécifiques permettant d'ordonner le flux de membrane.

1.3.1 Les cascades de Rab dans le trafic post-Golgi

La première cascade faisant intervenir des Rab a été démontrée dans la levure. Les vésicules de sécrétion sont contrôlées par la protéine G Sec4p, elle-même activée par son facteur d'échange Sec2p. Or, la Rab Ypt31p/Ypt32p, homologue de Rab11, interagit avec Sec2p alors que Sec2p n'a pas d'activité d'échange pour Ypt31p/Ypt32p [102]. La surexpression de Ypt31p/Ypt32p corrige le défaut de localisation d'un mutant de Sec2p, permettant de restaurer la sécrétion. Ainsi, la première cascade de Rab mise en évidence permet de coordonner les vésicules de sécrétion à partir du Golgi.

D'autres cascades ont ensuite été documentées dans les cellules de mammifères ou la levure, permettant d'expliquer en partie la directionnalité du flux membranaire (Figure 1-17). Par exemple, au sein du Golgi, il existe une cascade entre Rab6 et Rab33. La déplétion de Rab6 a le même effet que la déplétion de Rab33, suggérant une action dans la même voie de trafic [103]. En effet, il a ensuite été montré que la Rab33, localisée sur le *medial*-Golgi, recrutait le complexe Ric1-Rgp1 qui est un facteur d'échange de Rab6 [104].

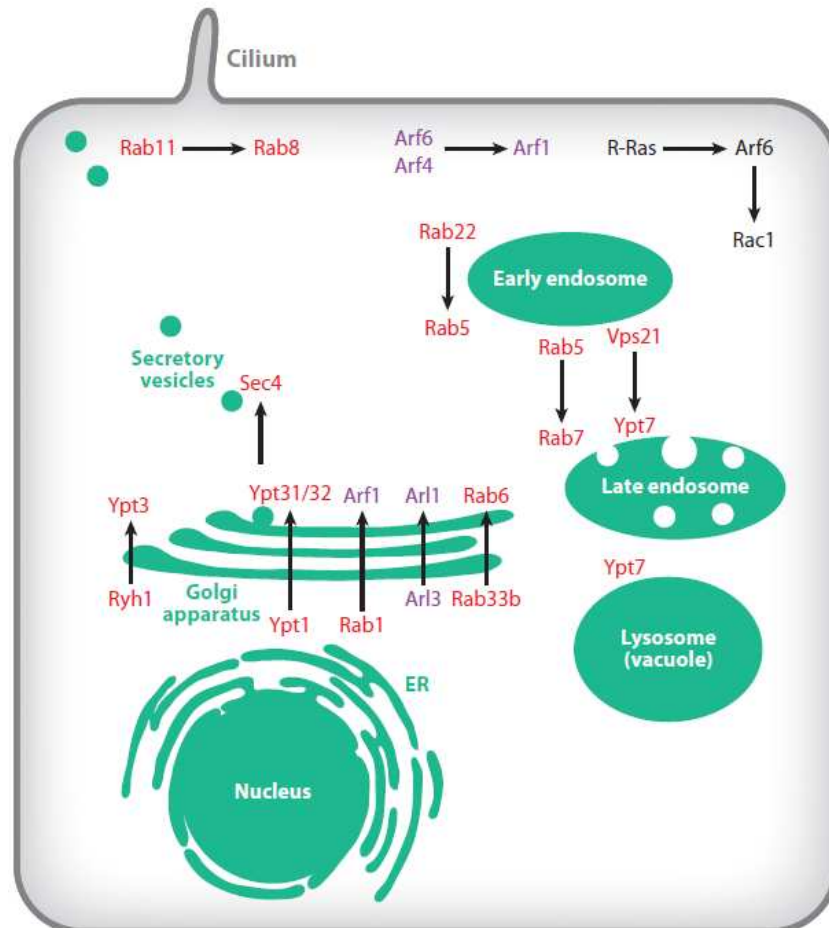


Figure 1-17 : Localisation des cascades de protéines G dans une cellule épithéliale [101]. De nombreuses cascades permettant l'inter-conversion entre les membres de la superfamille Ras ont été démontrées. En rouge, membre de la famille Rab ; en violet, les Arf et en noir les autres Ras.

1.3.2 GBF1, coordinateur de la voie sécrétoire précoce ?

La voie sécrétoire précoce correspond au transport des cargos entre le réticulum endoplasmique et le Golgi. Les cargos sont triés dans les ERES en interagissant avec le domaine luminal de Sec12, un facteur d'échange transmembranaire de la petite protéine G Sar1. L'activation de Sar1 par Sec12 permet de recruter le manteau COPII (formé des sous unités Sec23/24 et Sec13/31). Sec23 recrute TRAPPI [105], facteur d'attachement au Golgi et facteur d'échange de Rab1 [106]. Rab1 interagit avec les facteurs d'attachement GM130 et p115 permettant de former le *cis*-Golgi [96], [98]. Parallèlement, les vésicules COPII subissent une fusion homotypique sous l'action des SNARE syntaxine 5 et rsly1 [107], [108] (Figure 1-18).

La petite protéine G Rab1 interagit avec l'extrémité N-terminale de GBF1 [48]. Dans la cellule, GBF1 et Rab1 colocalisent sur les membranes de la voie sécrétoire précoce (ERGIC et Golgi). La déplétion de Rab1B induit une perte de la localisation de GBF1. Ces données suggèrent une cascade d'activation entre Rab1 et Arf1 passant par GBF1 permettant de former des vésicules COPI sur le ERGIC [99], [109] (Figure 1-18).

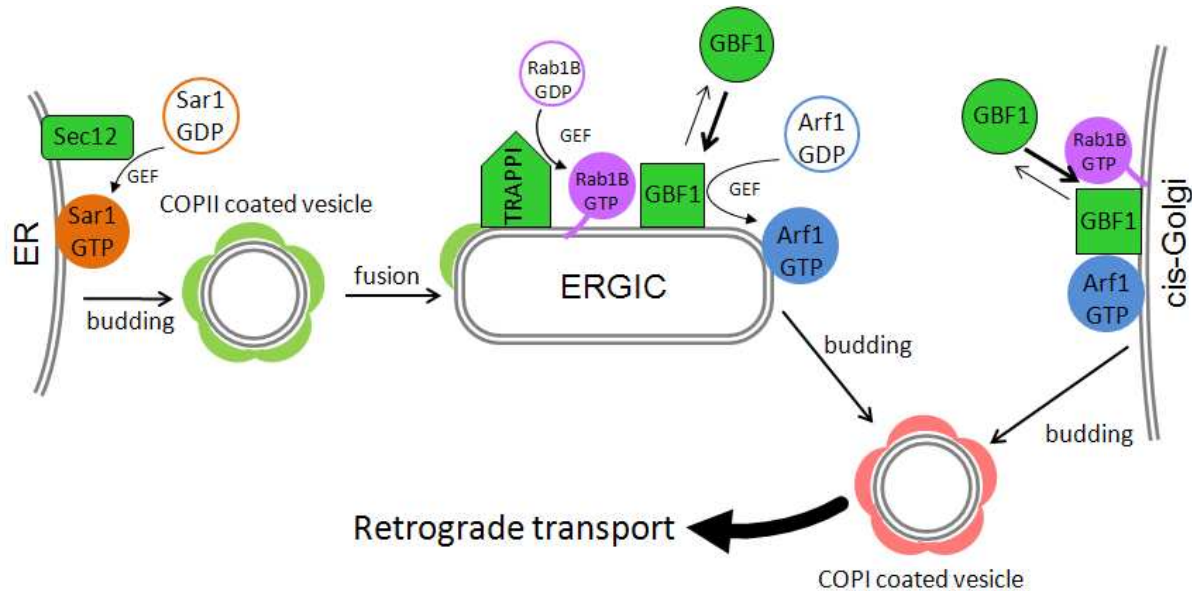


Figure 1-18 : Principe du fonctionnement de la cascade des protéines G dans la voie sécrétoire précoce. GEF : échange du GDP.

Le trafic vésiculaire assure un transport dirigé et contrôlé des cargos (protéines transportées par la vésicule). Cependant, les vésicules étant délimitées par une membrane, elles ont aussi un rôle important et peu exploré dans le trafic et l'homéostasie des lipides. Les lipides, malgré leur rôle fondamental pour la cellule sont les molécules les moins étudiées.

2 Membranes et Lipides

Les lipides (du grec *lipos*, graisse) communément appelés *corps gras* sont des molécules hautement énergétiques, nécessaires à la vie dont l'étude a longtemps été limitée à leur rôle structural (composition des membranes, voire 2.2 ci-dessous) et métabolique. Cependant, les lipides, qui forment une famille de molécules extrêmement diverses (cf. 2.1 ci-dessous), ont une importance socioéconomique majeure que nous aborderons brièvement (cf. 2.4 ci-dessous). Les lipides ont aussi un rôle majeur dans de nombreuses pathologies (cf. 3.3.2 ci-dessous). Cette importance en physiopathologie s'explique par l'intervention des lipides dans de nombreux processus cellulaires. Ainsi, le métabolisme des lipides (cf. 2.3 ci-dessous) est un processus conservé au cours de l'évolution.

2.1 Les lipides : une famille polymorphe

Les lipides sont des hydrocarbures pouvant être substitués et extraits par les solvants organiques. Par exemple, la méthode classique mise au point par Bligh et Dyer [110] reposant sur l'extraction des lipides par un mélange de méthanol et de chloroforme, permet d'extraire rapidement la plupart des lipides d'un échantillon biologique. Cette définition large des lipides permet de regrouper une grande variété de molécules organiques (plus de 37 000 lipides ont été recensés [111]) dont la propriété commune est d'être insoluble dans l'eau. Contrairement aux autres molécules organiques, les lipides ne sont pas caractérisés par une structure commune mais par une propriété physique commune. L'insolubilité des lipides peut être modulée par l'ajout de groupements polaires.

En raison de leur grande variété structurale, il n'existe pas de classification universelle des lipides. Cependant la nomenclature des lipides doit suivre les règles définies par l'IUPAC-IUB (*Commission on Biochemical Nomenclature* (CBN)) en 1976. La classification des lipides est arbitraire et se base, selon les auteurs, sur les propriétés par rapport à l'eau ou encore la complexité structurale croissante. Les lipides peuvent être classés en deux groupes :

1. Les lipides non hydrolysables regroupent des lipides simples composés d'une chaîne d'hydrocarbure, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, dont un ou plusieurs carbones peuvent porter une substitution conférant certaines propriétés particulières au lipide ;
2. Les lipides hydrolysables constituent la classe ayant la relevance biologique la plus importante. Ils sont composés de lipides et de groupements polaires associés par une liaison hydrolysable (ester, phosphodiester, thioester ou osidique).

Cette partie n'est pas une liste exhaustive de tous les lipides. Les terpènes, les glycolipides, ou les vitamines ne sont pas présentés.

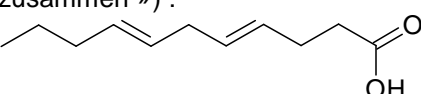
2.1.1 Les acides gras, lipides de base

Les acides gras sont des hydrocarbures ayant une chaîne linéaire de carbones (en général, entre 10 et 30 carbones) substituée par un groupement acide carboxylique (-COOH) sur le premier carbone. Les acides gras naturels possèdent un nombre pair de carbones, ce qui est expliqué par leur mode de synthèse (cf. 2.3.1). La chaîne d'hydrocarbure peut être un alcane (acide gras saturé), ou un alcène possédant une ou plusieurs liaisons double (C=C). On parle alors d'acide gras mono-insaturé ou polyinsaturé. Les acides gras sont exclusivement synthétisés par les organismes vivants et sont donc, à ce titre, l'une des signatures de la vie.

Tableau 2-1 : Nomenclature de quelques acides gras courants.

C	C=C	Nom usuel	Nom systématique	Abréviation*	T°C fusion
12		Acide laurique	Acide dodecanoïque	12:0	44,2
14		Acide myristique	Acide tétradécanoïque	14:0	53,9
16	0	Acide palmitique	Acide hexadécanoïque	16:0	63,1
	1	Acide plamitoléique		16:1 Δ^9 ou 16:1(n-7)	-0,5
18	0	Acide stéarique	Acide octodécanoïque	18:0	69,6
	1	Acide oléique		18:1 Δ^9 ou 18:1(n-9)	13,4
	2	Acide linoléique		18:2 $\Delta^{9,12}$ ou 18:2(n-6)	-5
	3	Acide α -linoléique		18:3 $\Delta^{9,12,15}$ ou 18:3(n-3)	-11
	3	Acide γ -linoléique		18:3 $\Delta^{6,9,12}$ ou 18:3(n-6)	-11
20	0	Acide arachidique	Acide docosanoïque	20:0	76,5
	4	Acide arachidonique		20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ ou 20:4(n-6)	-49,5

* le premier nombre indique le nombre d'atomes de carbone, le second indique le nombre de double liaisons C=C. La position des double liaisons est indiquée par l'exposant du signe Δ , compté à partir du carbone C₁ portant la fonction acide carboxylique. Une autre façon de préciser la position de l'insaturation est d'indiquer entre parenthèse la position de la première double liaison à partir de l'extrémité CH₃ de l'acide gras. Si ce n'est pas précisé par la lettre *t*, les liaisons C=C sont en position *cis* (ou Z pour « zusammen ») :

Exemple :  sera noté 11:2 $\Delta^{4,7}$ *t* ou 11:2(n-4)*t*

Les acides gras sont caractérisés, entre autre, par leur température de fusion qui dépend de la longueur de la chaîne de carbone (la température de fusion augmente avec le nombre de carbone) et du nombre de carbones insaturés (pour un nombre de carbones établi, la température de fusion diminue avec l'augmentation du nombre d'insaturation) (Tableau 2-1).

Les acides gras (poly)insaturés sont classés en trois familles :

1. Les oméga-3 (la première insaturation est sur le troisième carbone à partir de l'extrémité CH_3) sont apportés par les poissons gras et certaines huiles végétales (lin, colza, soja). L'homme ne possédant pas la capacité enzymatique nécessaire à leur synthèse, ils doivent obligatoirement être apportés par l'alimentation (acides gras essentiels) ;
2. Les oméga-6 (la première insaturation est portée par le sixième carbone en partant de l'extrémité CH_3) sont des acides gras essentiels apportés par les huiles végétales, les œufs et certaines viandes ;
3. Les oméga-9 (la première insaturation est portée par le neuvième carbone en partant de l'extrémité CH_3) ne sont pas des acides gras essentiels. Le principal oméga-9 est l'acide oléique 18:1(n-9).

2.1.2 Les stéroïdes, entre structure et communication

Selon l'IUPAC, les stéroïdes sont des lipides cycliques possédant une structure commune dérivée du cyclopentanphenanthrène (Figure 2-1 A) (pour les biochimistes, les stérols sont une catégorie à part entière incluant les stéroïdes). Parmi les stéroïdes, les stérols sont des molécules amphiphiles qui possèdent un groupement alcool sur le carbone 3 et une chaîne aliphatique variable sur le carbone 17 (Figure 2-1). Au sein des membranes, les stérols permettent de stabiliser une phase liquide ordonnée faisant la transition entre la phase solide (membrane trop rigide) et la phase liquide désordonnée (membrane non cohérente) [112]. Le stérol majoritaire est différent selon les espèces : cholestérol chez les animaux, sitostérol chez les plantes, et ergostérol chez les levures (Figure 2-1 B) [112].

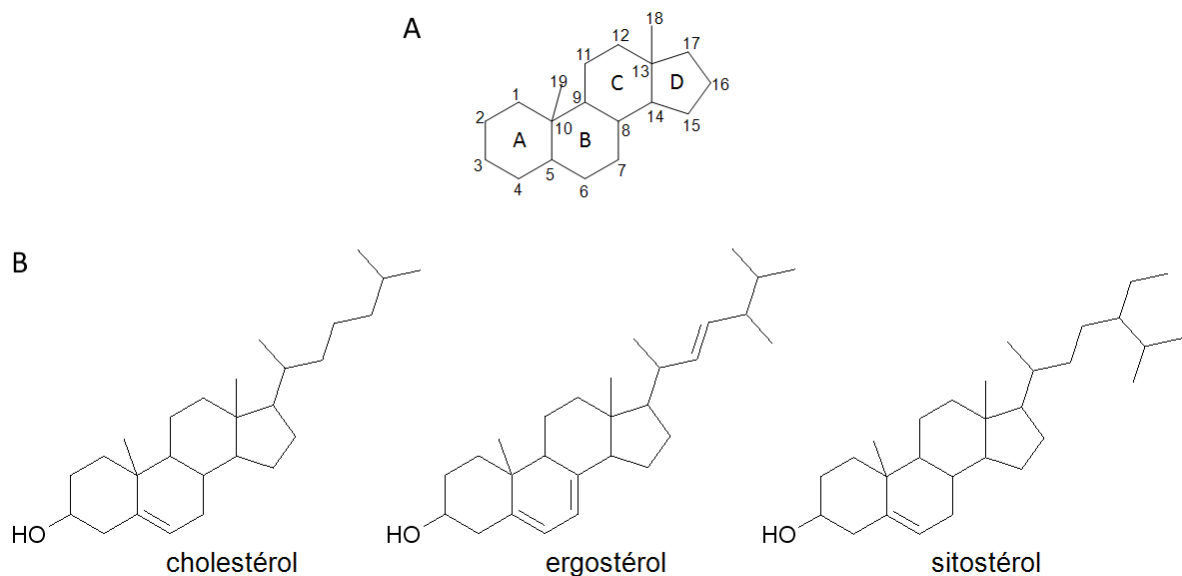


Figure 2-1 : Structure de quelques stérols. (A) structure du cyclopentanphenanthrène, noyau commun des stérols ; (B) structure des stérols membranaires des cellules animales (cholestérol), des levures et champignons (ergostérol) et des cellules végétales (sitostérol).

Chez l'Homme, le cholestérol provient en partie de l'alimentation (25%), mais la majorité est synthétisée *de novo* par les hépatocytes et les entérocytes par la voie du mévalonate (ou voie de l'HMG-CoA réductase) à partir de l'acétyl-coenzyme A

(Figure 2-2). La condensation de trois acétyl-CoA permet de former l'HMG-CoA qui est ensuite réduit en acide mévalonique par l'HMG-CoA réductase. Cette enzyme catalyse l'étape limitante de la voie et est inhibée par les statines. L'acide mévalonique est ensuite phosphorylé pour former l'IPP (isopentényl-pyrophosphate). La condensation de six IPP permet ensuite de former le squalène, terpène à 30 atomes de carbone dont la cyclisation permet de former le lanostérol puis le cholestérol. Le cholestérol est ensuite soit directement inséré dans les membranes, soit exporté sous forme de lipoparticules dans le sang, soit estérifié et stocké dans les gouttelettes lipidiques.

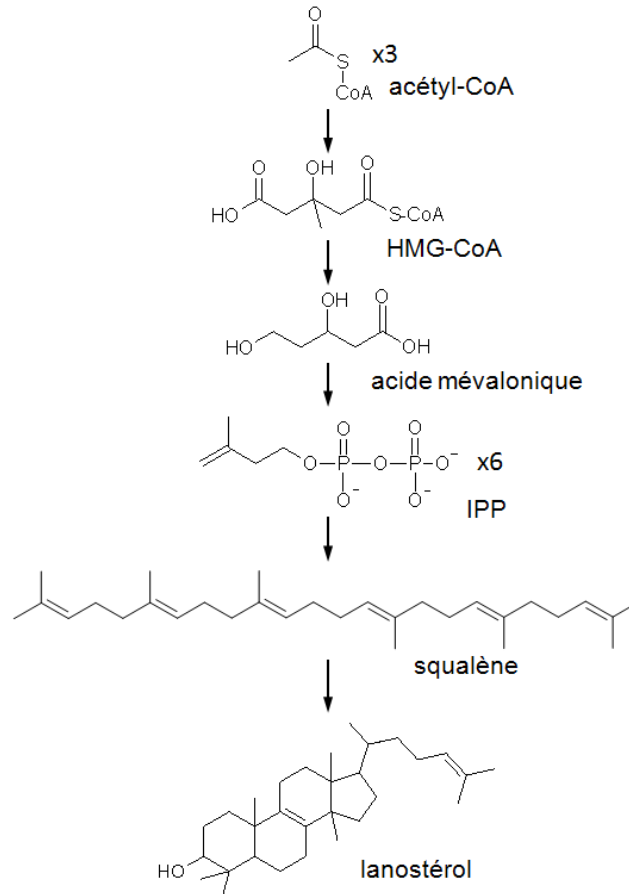


Figure 2-2 : Voie simplifiée de la biosynthèse *de novo* du cholestérol à partir d'acétyl-Coenzyme A. HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A ; IPP : isopentényl-pyrophosphate.

Outre leur rôle structural dans les membranes biologiques, les stéroïdes sont aussi des molécules importantes pour la communication intercellulaire sous forme d'hormones stéroïdiennes. Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées à partir du cholestérol. Il existe cinq familles d'hormones stéroïdiennes chez l'homme (Figure 2-3) :

1. Les minéralocorticoïdes (exemple : aldostérone) sont impliqués dans la régulation de la pression artérielle en agissant sur la rétention rénale du sodium et l'élimination du potassium en cas d'hypertension ;
2. Les glucocorticoïdes (exemple : cortisol) sont des hormones sécrétées par les glandes surrénales selon un rythme circadien. Ils sont impliqués dans le métabolisme des protéines, des glucides et dans la modulation de la

réponse immunitaire (action anti-inflammatoire, antipyrétique, antiallergique et diminuent de façon globale les défenses immunitaires). Les glucocorticoïdes de synthèse sont utilisés dans le traitement des affections inflammatoires rhumatologiques et auto-immunes, de l'asthme, de l'allergie, de certaines leucémies et comme traitement palliatif pour leur effet analgésique. Ils sont aussi utilisés dans le traitement antirejet après les greffes d'organes ;

3. Les androgènes (exemple : testostérone) sont les hormones mâles synthétisées par les testicules ;
4. Les oestrogènes (exemple : estradiol) sont synthétisés majoritairement par les ovaires chez la femme mais peuvent aussi être synthétisés dans le foie et les tissus adipeux ;
5. Les progestagènes (exemple : progestérone) sont les hormones femelles, synthétisées par les corps jaunes au sein du tissu ovarien.

Les hormones sexuelles sont sécrétées par les gonades et participent à la mise en place des caractères sexuels primaires lors du développement et secondaires lors de la puberté. Ils sont ensuite responsables du fonctionnement de l'appareil reproducteur (spermatogenèse chez l'homme, contrôle du cycle menstruel et de la gestation chez la femme). En outre, les œstrogènes sont impliqués dans le développement du système nerveux et l'homéostasie osseuse.

Les ecdystéroïdes (exemple : ecdysone) sont les premières hormones stéroïdiennes à avoir été extraites et sont impliquées dans les phénomènes de mue des arthropodes. Enfin, les plantes sécrètent des brassinostéroïdes qui sont impliqués dans le développement (Figure 2-3).

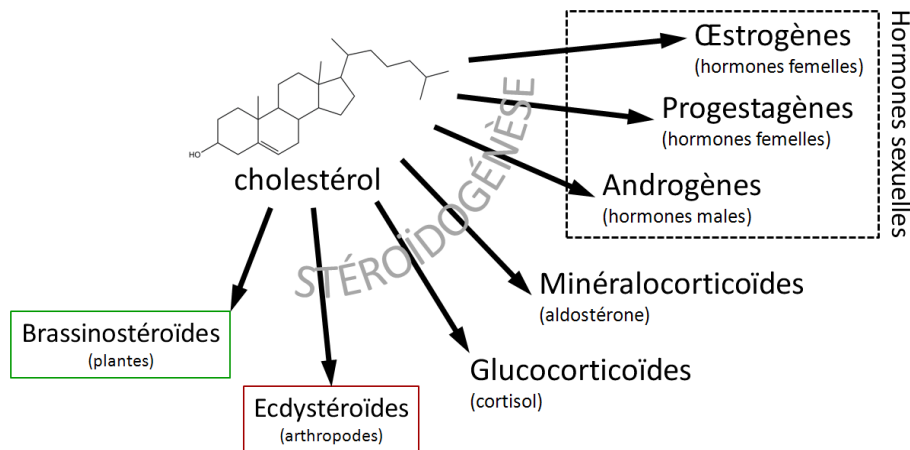


Figure 2-3 : Les hormones stéroïdiennes dérivent du cholestérol grâce à la stéroïdogénèse.

Les hormones stéroïdiennes traversent la membrane des cellules et se fixent sur leur récepteur cytoplasmique. La fixation de l'hormone sur son récepteur permet son transport dans le noyau où il agit ensuite comme facteur de transcription pour activer l'expression des gènes cibles.

2.1.3 Les glycérophospholipides, lipides membranaires

Les glycérophospholipides (parfois aussi appelés phospholipides) sont les principaux constituant des membranes biologiques. Il s'agit d'un glycérol (alcool

trifonctionnel) estérifié par deux acides gras sur les positions *sn-1* et *sn-2* et un groupement phosphate sur la position *sn-3* (Figure 2-4).

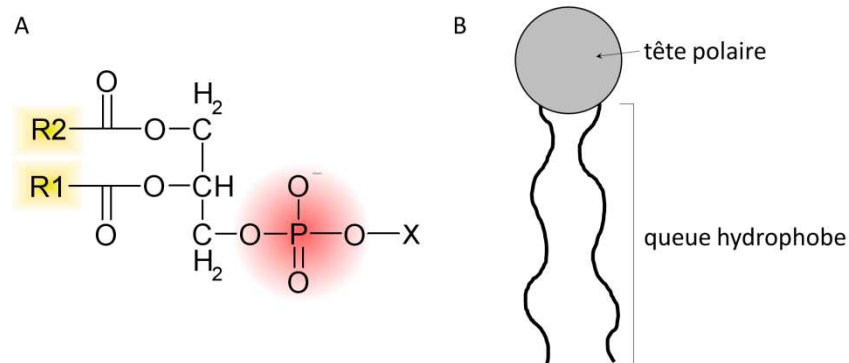


Figure 2-4: Structure d'un glycérophospholipide. (A) Un glycérol est estérifié par deux acides gras (jaune) en position *sn-1* et *sn-2* et un groupement phosphate (rouge) en position *sn-3* ; (B) Représentation schématique traditionnelle d'un glycérophospholipide

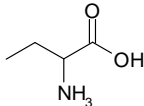
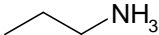
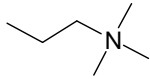
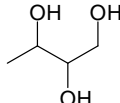
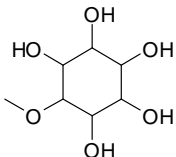
Le groupement phosphate peut lui-même être substitué pour ajouter un groupement hydrophile. Il existe six têtes de phospholipides majeurs (Tableau 2-2) :

1. Deux phospholipides neutres : phosphatidyléthanamine (PE) et phosphatidylcholine (PC) ;
2. Quatre phospholipides chargés négativement : acide phosphatidique (PA), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI) et phosphatidylglycérol (PG).

De plus, le groupement inositol peut être phosphorylé sur les positions 3, 4 ou 5 (cf. 3.1.2).

Les deux acides gras peuvent être différents. Souvent, l'une des chaînes porte une insaturation. Ainsi, la variabilité des glycérophospholipides possibles est très large. En prenant 11 acides gras différents (Tableau 2-1) et 6 groupements possibles (Tableau 2-2) on peut former 726 molécules distinctes. En réalité, la variabilité des acide gras est plus importante (longueur des chaînes d'acide gras, nombre d'insaturation, conformation *cis* ou *trans*, hydroxylation, branchement, modification des groupements polaires, etc.) [113].

Tableau 2-2 : Structure et caractéristique des glycérophospholipides majeurs.

-X		Nom	Symbole	Charge nette
-H		acide phosphatidique	PA	Négative
-CH ₂ CH(NH ₃)COOH		phosphatidylsérine	PS	Négative
-CH ₂ CH ₂ NH ₃		phosphatidyléthanolamine	PE	Neutre
-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₃		phosphatidylcholine	PC	Neutre
-CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH		phosphatidylglycérol	PG	Négative
-OC ₆ H ₁₁ O ₅		phosphatidylinositol	PI	Négative

2.1.4 Les acylglycérols, molécules de stockage de l'énergie

Les acylglycérols sont des esters de glycérol et d'un acide gras (monoacylglycérol, MAG), de deux acides gras (diacylglycérol, DAG) ou de trois acides gras (triacylglycérol, TAG). Les monoacylglycérols et diacylglycérols sont des précurseurs importants dans les voies métaboliques notamment la voie de synthèse des phospholipides. Les triacylglycérols sont la forme de stockage des acides gras dans les cellules (animales ou végétales) et, donc, les composants majeurs des graisses animales et des huiles végétales (cf. 2.4.1). Les sources naturelles de triacylglycérols contiennent des mélanges plus ou moins complexes d'acides gras, de longueur et d'insaturation variées.

La synthèse des monoacylglycérols et des diacylglycérols est assurée par une glycérol-3-phosphate acyltransférase qui permet d'ajouter un acide gras sur les positions *sn*-1 et *sn*-2 [114]. La synthèse des triacylglycérols est assurée par deux protéines, les diacylglycérol acyltransférases (DGAT1 et DGAT2) qui ajoutent un groupement acyle sur la position *sn*-3 d'un diacylglycérol [115]. Les enzymes DGAT1 et DGAT2 ne sont pas homologues et ne sont pas redondantes (Figure 2-5) [116]. Les souris *Dgat1*^{-/-} ne présentent pas de phénotype majeur, sont viables et résistantes à l'obésité [115]. Inversement, les souris *Dgat2*^{-/-} ne sont pas viables et

présentent une diminution importante du contenu en triacylglycérol induisant des défauts de l'homéostasie énergétique et de la barrière cutanée [117].

La DGAT1 est exprimée majoritairement dans les muscles squelettiques, la peau, les intestins et les testicules où il assure la ré-esterification rapide des triacylglycérols. Dans les muscles squelettiques, la synthèse de triacylglycérols permet de stocker l'énergie apportée massivement lors de la prise alimentaire puis de la réutiliser lors d'efforts entre les repas. Dans les intestins, DGAT1 assure la ré-esterification des triglycérides à partir des précurseurs issus de l'absorption des produits de la digestion (acides gras libres et monoacylglycérols) pour former des lipoprotéines qui seront exportées vers le foie (cf. 2.3.3 ci-dessous).

La DGAT2 est majoritairement exprimée dans le foie et les adipocytes où elle promeut la synthèse *de novo* de triacylglycérols à partir du glycérol et d'acides gras ; dans le cas d'un excès de glucose. Les triacylglycérols ainsi synthétisés sont alors stockés dans les gouttelettes lipidiques.

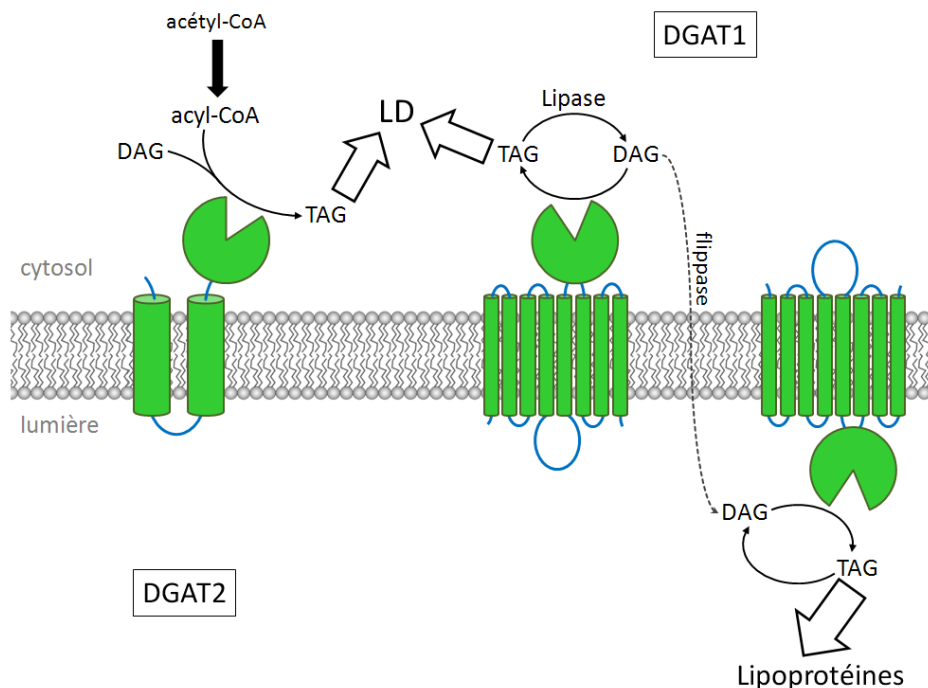


Figure 2-5 : Topologie des DGAT sur la membrane du réticulum endoplasmique. DGAT2 possède une seule topologie où le site actif catalyse la synthèse *de novo* des triacylglycérols (TAG) dans le cytoplasme, permettant la formation des gouttelettes lipidiques (LD). DGAT1 possède une double topologie [118], le site actif pouvant être exposé vers le cytosol ou vers la lumière du réticulum endoplasmique lisse (les TAG seront ensuite sécrétés hors de la cellule sous forme de lipoprotéines).

Les DGAT sont des protéines membranaires du réticulum endoplasmique [116], [119]. La DGAT1 a la particularité d'être à la fois exposée vers le cytosol et vers la lumière du réticulum (Figure 2-5) [118] ce qui permet de synthétiser des triacylglycérols du côté cytoplasmique (formation des gouttelettes lipidiques intracellulaires) et du côté luminal (formation de lipoparticules qui seront sécrétées).

2.1.5 Les sphingolipides

Les sphingolipides sont des lipides dérivés de la sphingosine, un amino-alcool à 18 carbones contenant une chaîne aliphatique insaturée (Figure 2-6). La sphingosine est synthétisée par condensation du palmitoyl-CoA et d'une sérine par une sérine palmitoyltransférase dans le réticulum endoplasmique [120]. L'acylation de la fonction amine en C2 permet de former le céramide (Figure 2-6). L'acyl-CoA utilisé pour réaliser cette réaction est variable, résultant en une famille de céramides qui diffèrent par leurs chaînes d'acide gras [121]. Le céramide libre est rare dans les membranes et la dernière fonction alcool est généralement substituée.

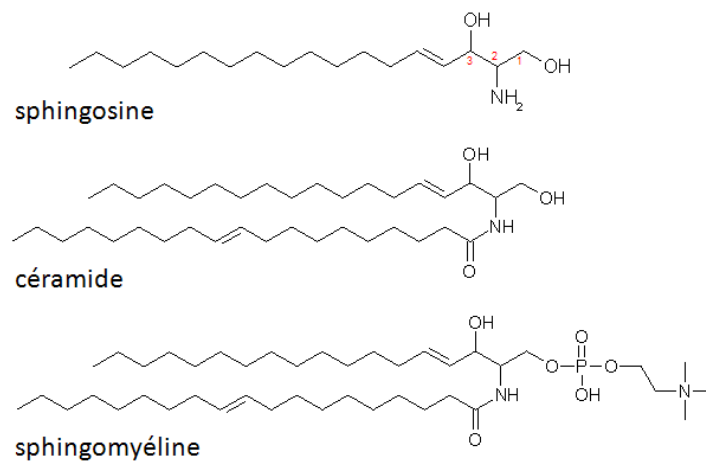


Figure 2-6 : Structure des sphingolipides [122]. La sphingosine est un amino-alcool à 18 carbones. Le céramide est issu de la transamination d'un acyl-CoA sur la fonction amine du carbone 2. La sphingomyéline est le sphingolipide le plus abondant et est un céramide phosphorylé par une phosphocholine.

La phosphorylation du carbone 1 permet de former les phosphosphingosines, précurseurs des sphingomyélines. Les sphingomyélines portent une choline et plus rarement une éthanoline ou un inositol sur le groupement phosphate (Figure 2-6) [122]. Enfin l'ajout d'un ose ou d'un polyoside sur le carbone 1 d'un céramide permet de former les séries des glycosphingolipides (Figure 2-7) (aussi appelé cérebrosides si un seul ose est attaché). Les molécules formées (non détaillées ici) peuvent être regroupées en plusieurs classes :

1. Les galactosphingolipides dont le premier sucre est un galactose ;
2. Les glucosphingolipides dont le premier sucre est un glucose ;
3. Les gangliosides sont des glucosphingolipides contenant un ou plusieurs acides sialiques.

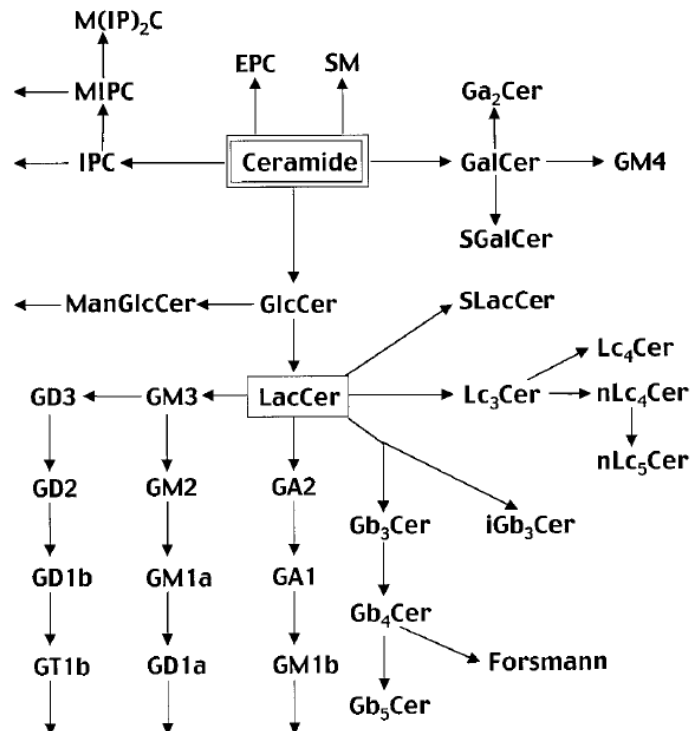


Figure 2-7 : Voies de synthèse des glycosphingolipides [123]. Le céramide est le précurseur de la série des inositol phosphocéramides (IPC), des éthanolamines phosphocéramides (EPC) et des sphingomyélines (SM). La glycosylation du céramide par un galactose permet de former les lipides de la série des galactosphingolipides (GalCer) ; par un glucose permet de former la série des glucosphingolipides (GlcCer) dont font parti les gangliosides, désignés couramment par la nomenclature de Svennerholm [124].

En raison de leur nature hydrophobe, les céramides sont insérés dans les membranes. Les céramides sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique avant d'être exportés vers le *trans*-Golgi où ils sont glycosylés [123]. Le transport des sphingolipides peut se faire *via* les vésicules de transport ou par des protéines dédiées comme la CERT (céramide transférase) qui transfère un céramide du réticulum endoplasmique au Golgi. Les sphingolipides sont ensuite majoritairement exportés vers la membrane plasmique où ils auraient tendance à se regrouper en microdomaines qui pourraient coalescer pour former des macrodomaines à l'origine des *radeaux lipidiques* [125]. La fonction des sphingolipides à la membrane n'est pas seulement structurale. En effet, outre la fonction de protection apportée, les sphingolipides et en particulier les céramides sont maintenant reconnus comme des médiateurs importants de la transduction du signal dans le contrôle de l'apoptose, de la croissance cellulaire ou de la différenciation [126].

2.2 Les membranes biologiques, une mosaïque fluide

2.2.1 Le modèle de la bicouche lipidique

Comment se représente-t-on la membrane ?

Les glycérophospholipides (phospholipides) sont des molécules amphiphiles (cf. 2.1.3 ci-dessus) qui s'associent spontanément entre elles pour diminuer les interactions avec le solvant aqueux. Dans la cellule, les phospholipides sont associés de façon antiparallèle pour former une bicouche plane (structure lamellaire) dans laquelle sont insérés, en proportion variable, des protéines, des glycoprotéines et des glycolipides (Figure 2-8). Le modèle actuel est celui de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson en 1972 [127] dans lequel les lipides et les protéines insérés diffusent librement au sein d'un espace à deux dimensions. Récemment, des améliorations ont été apportées à ce modèle pour prendre en compte les données de biophysiques (Figure 2-8) [128]. Par exemple, le *mattress model* proposé par Mouritsen et Bloom en 1984 [129] prend en compte la possibilité de regrouper les lipides en domaines permettant d'accommoder l'insertion de protéines de taille et de propriété physico-chimique variables. Plus récemment, la possibilité d'hétérogénéité latérale est de plus en plus discutée. Dans ce modèle, la composition lipidique de la membrane n'est pas uniforme et aléatoire mais constituée de microdomaines où les interactions entre phospholipides permettent de stabiliser une organisation latérale de la membrane [130].

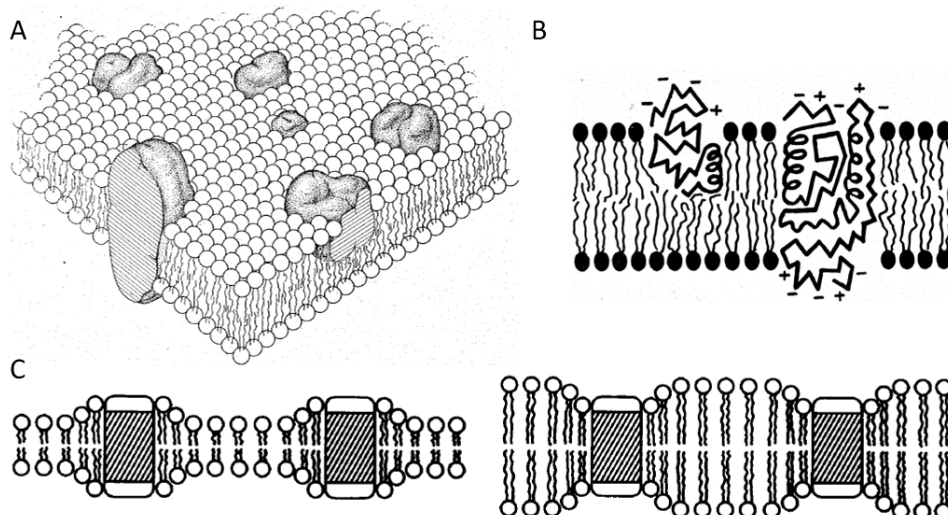


Figure 2-8 : Modèle de la mosaïque fluide. (A) Modèle Singer-Nicolson proposant le modèle de la mosaïque fluide [127] ; (B) Schéma de la membrane montrant une protéine périphérique insérée dans un feuillet de la membrane (à gauche) et une protéine transmembranaire traversant les deux feuillets (à droite) ; (C) raffinement du modèle de la mosaïque fluide (*mattress model*, [129]) montrant la possibilité thermodynamique de regroupement de lipides pour permettre d'accommoder des domaines transmembranaires d'épaisseurs variables.

Les membranes sont des phases fluides

Les phospholipides sont extrêmement mobiles au sein d'une bicouche. La diffusion des lipides est rapide au sein de la membrane (un lipide donné peut traverser toute la longueur de la cellule en moins d'une minute) [131]. La constante de diffusion des phospholipides peut être déterminée par des méthodes expérimentales comme par exemple la mesure en résonnance magnétique nucléaire par la méthode des gradients de champs pulsés [132] ou par corrélation de la fluorescence en microscopie (FCS, *fluorescence correlation spectroscopy*). Ainsi la diffusion des phospholipides dans les membranes est de l'ordre de $10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. La diffusion des phospholipides est modulée par la température, la composition des chaînes d'acides gras, la nature du groupement polaire et la composition de la membrane. Ainsi la présence de stérol induit une diminution du coefficient de diffusion [132].

Les phospholipides sont des molécules non structurées subissant de nombreux mouvements intramoléculaires des chaînes d'acides gras et de la tête polaire (Figure 2-9). Les phospholipides ont aussi des mouvements de rotation autour de leur axe moléculaire ainsi que des mouvements verticaux rapides (protrusion transitoire hors de la bicouche). Enfin le passage d'un feuillet à l'autre est un mouvement énergétiquement défavorable (la tête polaire doit traverser la zone apolaire des queues hydrophobes) qui présente une cinétique lente (de l'ordre de l'heure). Dans les membranes biologiques, le passage d'un feuillet à l'autre (*flip-flop*) est catalysé par des *flip-floppases* [133].

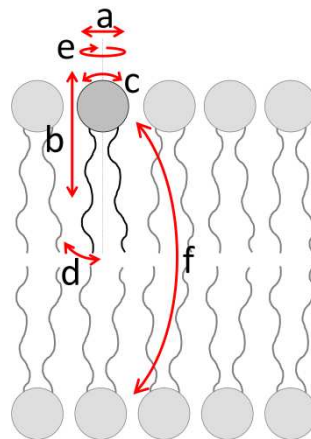


Figure 2-9 : Représentation schématique des mouvements d'un phospholipide au sein de la bicouche [134]. Chaque phospholipide est soumis à la diffusion latérale (a) et à des mouvements verticaux (protrusion) (b). La possibilité d'une rotation autour de la liaison C-C induit des mouvements de balancier de la tête (c) et de la queue (d). Le phospholipide subit aussi des mouvements de rotation autour de son axe moléculaire (e). Le mouvement d'une monocouche à une autre est long (f) (heures) et peut être accéléré dans les membranes biologiques par des flippases.

Une membrane présente donc les propriétés d'un fluide au sein duquel diffusent des protéines. Dans les membranes biologiques, la diffusion latérale des protéines et des lipides peut être restreinte dans des domaines membranaires délimités par des ancrages protéiques liés au cytosquelette.

Les membranes sont des surfaces d'échanges

Les membranes sont des barrières sélectives, imperméables à la plupart des ions et des macromolécules dissoutes dans le milieu extracellulaire. Certaines petites molécules non chargées (O_2 , CO_2) peuvent librement diffuser au travers des membranes selon leur gradient. La perméabilité aux autres molécules (ions, molécules polaires et macromolécules) est sélectivement apportée par des protéines spécifiques dont l'activité est constitutive ou contrôlée. Le transport des molécules peut se faire selon leur gradient (diffusion facilitée) par des canaux ou des transporteurs (Figure 2-10), ce qui ne nécessite pas d'apport énergétique. Les molécules peuvent aussi être transportées contre leur gradient lorsque le transport est couplé à une source d'énergie. Le transport actif primaire est défini lorsque l'énergie est utilisée pour réaliser le transport. Dans le transport actif secondaire, le transport est réalisé en parallèle du transport d'une autre molécule, selon son gradient. On parle alors de symport si les deux molécules sont transportées du même côté de la membrane ou d'antiport lorsque les deux molécules sont échangées.

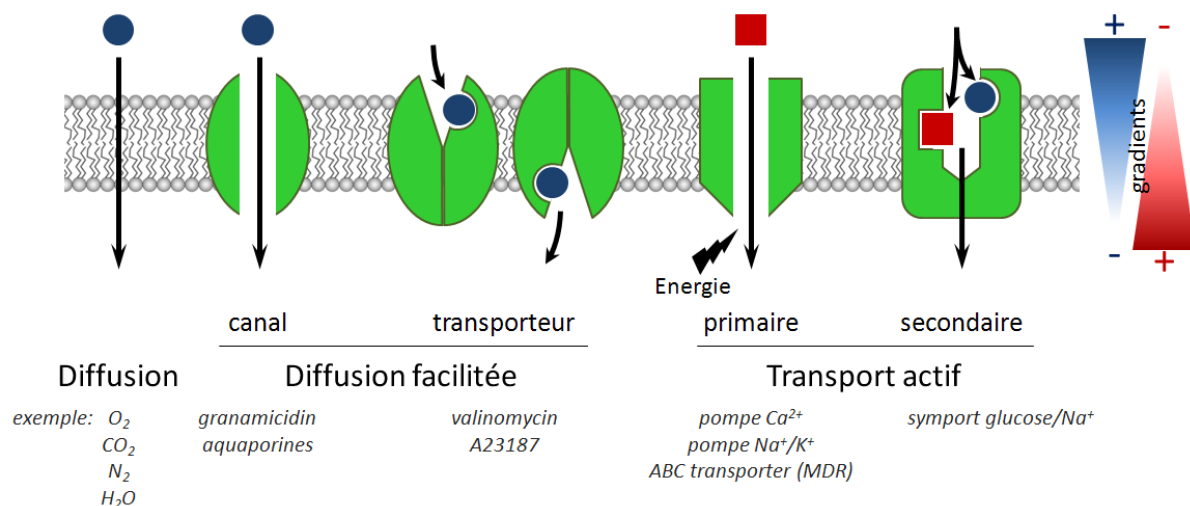


Figure 2-10 : La membrane est une barrière sélective. Certaines petites molécules apolaires peuvent diffuser librement à travers la membrane selon leur gradient électrochimique (indiqué à droite du schéma). Pour les molécules chargées (ions) ou polaires, la traversée de la membrane est assurée par des canaux (dont l'ouverture peut être contrôlée par différents stimuli) ou des transporteurs. Lorsqu'une molécule est transportée contre son gradient (en rouge), un apport d'énergie est nécessaire (ATP, réduction d'un cofacteur, photon, gradient électrochimique d'une molécule co-transportée).

Les membranes sont aussi des interfaces d'échange d'informations *via* des interactions ligand-récepteur. La *transduction* du message est un ensemble de mécanisme permettant à la cellule de s'adapter aux modifications de son environnement. Pour cela, les signaux extracellulaires (chimiques – *hormones*, *neuromédiateurs*, *chimiokines* ou physiques – *pression*, *pH*, *luminosité*, *champ électrique* ou *magnétique*) agissent sur un récepteur spécifique inséré dans la membrane ou intracellulaire. Le récepteur activé va modifier l'activité de la cellule en activant une cascade de signalisation intracellulaire passant ou non par la libération d'un second messager. La réponse de la cellule, variée et complexe, peut conduire à la modification de l'expression de gènes cibles, l'activation de voies

biochimiques, la sécrétion d'une autre molécule, etc.. De plus, les différentes voies de signalisation, souvent tissu spécifiques, peuvent interagir entre elles.

Les récepteurs couplés à une protéine G (GPCR, *G protein-coupled receptor*) forment une vaste famille multigénique (environ 800 gènes chez l'Homme) [135–137] de récepteurs membranaires permettant de *sentir* de nombreux signaux extracellulaires. Les GPCR possèdent 7 domaines transmembranaires formant la structure de base, d'une partie extracellulaire variable permettant d'accommoder le ligand et d'une partie intracellulaire interagissant avec les protéines G (Figure 2-11) [138]. L'activation des GPCR par la fixation du ligand induit un changement de conformation des segments transmembranaires qui expose le site de fixation de la protéine G [139], [140]. Le GPCR subit des modifications post-traductionnelles dont la glycosylation de la partie N-terminale extracellulaire et une palmitoylation sur la partie C-terminale intracellulaire [141]. La palmitoylation permettrait la localisation du GPCR dans les *radeaux lipidiques*. Enfin, le GPCR activé est phosphorylé par des kinases de GPCR (GRK, *GPCR kinases*) sur l'extrémité C-terminale (Figure 2-11) [142], [143]

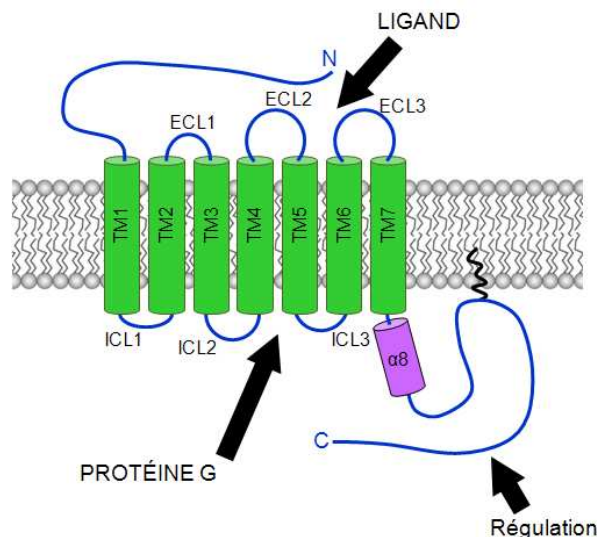


Figure 2-11 : Structure des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR). Les GPCR possèdent 7 domaines transmembranaires (TM1-7), une partie extracellulaire formée de l'extrémité N-terminale et de trois boucles extracellulaires (ECL1-3) ; une partie intracellulaire formée de l'extrémité C-terminale, de trois boucles intracellulaires (ICL1-3) et d'une hélice alpha ($\alpha 8$). Le ligand se fixe entre les TM3 et TM5-7, ce qui induit un changement de conformation des TM5-7 permettant la fixation de la protéine G sur les ICL2-3. Les GPCR sont régulés par des modifications post-traductionnelles sur l'extrémité C-terminale (phosphorylation et palmitoylation).

Les GPCR sont la cible de nombreuses molécules pharmacologiques actives. C'est pourquoi ils représentent une famille d'intérêt, saluée par l'attribution du prix Nobel de chimie en 2012 à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka pour leurs travaux sur la compréhension du mécanisme de fonctionnement des GPCR. La protéine G couplée au GPCR est une protéine trimérique formée d'une sous unité α palmitoylée et d'un dimère $\beta\gamma$ associé à la membrane par une ancre GPI sur la sous-unité γ . L'activation du récepteur permet de découvrir le domaine GEF permettant d'activer la protéine G par échange du GDP par un GTP sur la sous-unité α . La fixation du GTP induit la dissociation de la sous-unité α et du dimère

$\beta\gamma$, chacun pouvant activer des effecteurs spécifiques. L'hydrolyse du GTP permet d'inactiver la sous-unité α et la reformation du trimère inactif $\alpha\beta\gamma$ (Figure 2-13).

La sous-unité α de la protéine G activée interagit avec des effecteurs spécifiques qu'elle active (sous-unité α_s) ou inhibe (sous-unité α_i). Par exemple, l'une des cibles de la sous-unité α est l'adénylate cyclase dont l'activation permet de former le second messenger AMP cyclique (AMPc) à partir d'ATP. L'AMPc permet d'activer, entre autres, la protéine kinase A (PKA) qui, à son tour module l'activité de protéines cibles par phosphorylation.

Une autre cible de la sous-unité α est la phospholipase C dont l'activation à la membrane permet de former de l'inositol(1,4,5)-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) à partir d'un phosphatidylinositol(4,5)-diphosphate (PtIns(4,5)P2). L'IP3 permet d'ouvrir des canaux calciques du réticulum endoplasmique, ce qui induit un pic de concentration de Ca^{2+} dans le cytosol. Le calcium et le DAG activent la protéine kinase C (PKC) pour permettre de phosphoryler des protéines cibles.

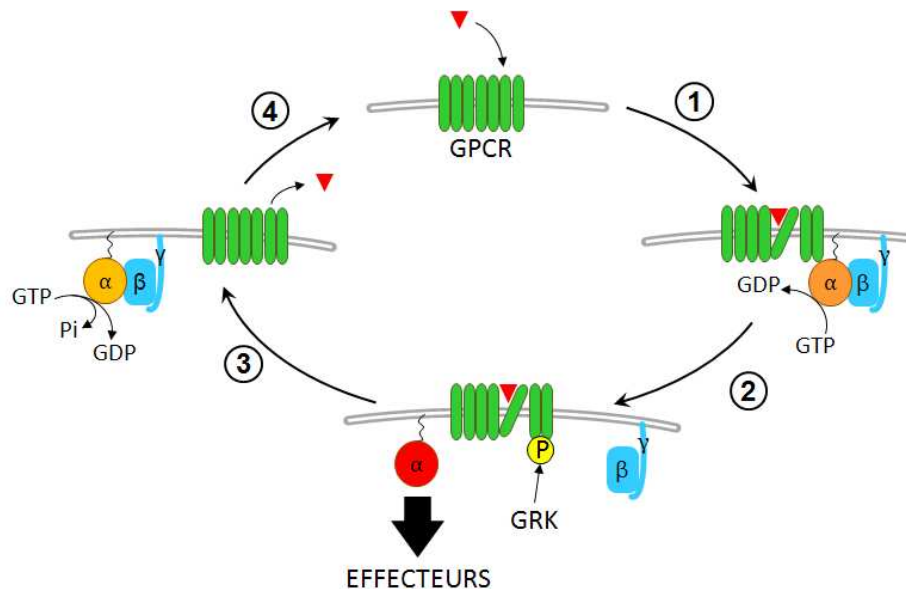


Figure 2-12 : Cycle d'activation / désactivation des GPCR. (1) La fixation du ligand induit un changement de conformation des hélices transmembranaires du GPCR ; (2) l'exposition du site GEF permet d'activer la sous-unité α de la protéine G qui se dissocie du dimère $\beta\gamma$; (3) la sous-unité α activée induit une cascade de signalisation en activant ou en inhibant des effecteurs spécifiques. L'activation du GPCR induit sa phosphorylation par une kinase de GPCR (GRK) ; (4) la protéine G est désactivée par hydrolyse du GTP ce qui permet de reformer le trimère $\alpha\beta\gamma$ inactif. La libération du ligand permet le retour à l'état basal.

Une autre voie de transduction indépendante des GPCR passe par des récepteurs à activité tyrosine kinase. La fixation du ligand (souvent multimérique) induit une oligomérisation des récepteurs qui seront activés par transphosphorylation de la partie intracellulaire. Cette phosphorylation est reconnue par des protéines adaptatrices spécifiques permettant d'induire une cascade de signalisation dans la cellule. L'un d'elle est la voie de l'Akt. La fixation de l'EGF sur son récepteur (EGFR) induit la phosphorylation sur les résidus tyrosine permettant de recruter, à la membrane, la kinase PI3K. PI3K phosphoryle le PtIns(4,5)P2 pour former du PtIns(3,4,5)P3 permettant de recruter à la membrane et, ainsi, d'activer Akt (ou protéine kinase B, PKB). Akt possède de

nombreuses cibles intracellulaires impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire (notamment la voie mTOR).

2.2.2 L'influence du paramètre de *packing* sur la courbure

Les glycérophospholipides occupent un volume défini dans l'espace pouvant être assimilé à un cône tronqué (Figure 2-13). Le rapport entre la taille du groupement polaire et des chaînes d'acides gras permet de définir le paramètre de *packing*. Si le volume occupé par le groupement polaire (caractérisé par a^0) est similaire au volume occupé par les acides gras (caractérisé par b^0) alors le phospholipide occupe un cylindre parfait (cas du PC et du PS par exemple). Dans ce cas, le paramètre de *packing* S_0 est proche de 1 (Tableau 2-3). Dans les autres cas, si le paramètre de *packing* est inférieur à 1, le phospholipide occupe un cône inversé. Si S_0 est supérieur à 1, le phospholipide occupe un volume conique.

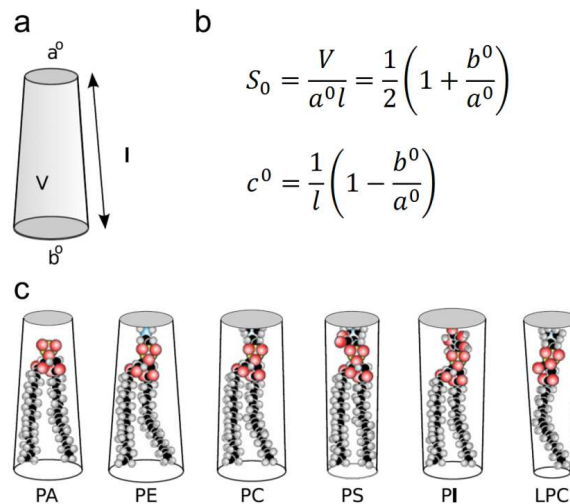


Figure 2-13 : Représentation de l'encombrement spatial des phospholipides membranaires [144]. (a) Définition des paramètres utilisés pour le calcul des paramètres de structuration des lipides. a^0 ; aire du groupement polaire. V ; volume occupé par la molécule. l ; longueur de la molécule. b^0 ; aire de la base. (b) Formules utilisées pour calculer le paramètre de *packing* (S_0) et le rayon de courbure spontanée d'une monocouche (c^0). (c) représentation de l'encombrement spatial des principaux phospholipides membranaires (voir Tableau 2-3).

Un acide gras insaturé occupe un volume moins important qu'un acide gras portant une ou plusieurs insaturations. En effet, les insaturations induisent des coudes plus rigides dans la chaîne de carbone. Le volume occupé par la chaîne de carbone est le volume moyen dans lequel se trouvent les atomes.

Tableau 2-3 : Données de structuration des principaux lipides membranaires. [144]. (voire Figure 2-13).

	PA	PE	PC	PS	PI	LPC
a^0 (Å ²)	45	54	72	54	84	60
b^0 (Å ²)	73	105	87,8	45	65	33
S_0	1,31	1,47	1,11	0,92	0,89	0,78
c^0 (Å ⁻¹)	-0,029	-0,043	-0,010	0,0075	0,01	0,020

LPC : lisophosphatidylcholine

Remarque : le paramètre de *packing* ainsi défini dépend des acides gras qui composent le phospholipide (le nombre d'insaturation influence les paramètres b^0 et l)

Le paramètre de *packing*, qui représente l'encombrement spatial des phospholipides, est corrélé à la courbure spontanée induite dans une monocouche de phospholipides (Figure 2-14). Ainsi, les phospholipides ayant un paramètre de *packing* supérieur à 1 (queue hydrophobe plus développée que la tête hydrophile) (exemple PA et PE, Tableau 2-3) sont à l'origine d'une courbure négative. Inversement les phospholipides ayant un paramètre de *packing* inférieur à 1 (tête hydrophile plus développée que la queue hydrophobe) (PI et LPC, Tableau 2-3) sont à l'origine d'une courbure positive. Enfin, les lipides ayant une forme conique parfaite ne génèrent pas de courbure et se retrouvent dans une structure plane. La forme spatiale des phospholipides est directement corrélée à la structure observée des agrégats (micelle inverse, micelle ou structure lamellaire) (Figure 2-14).

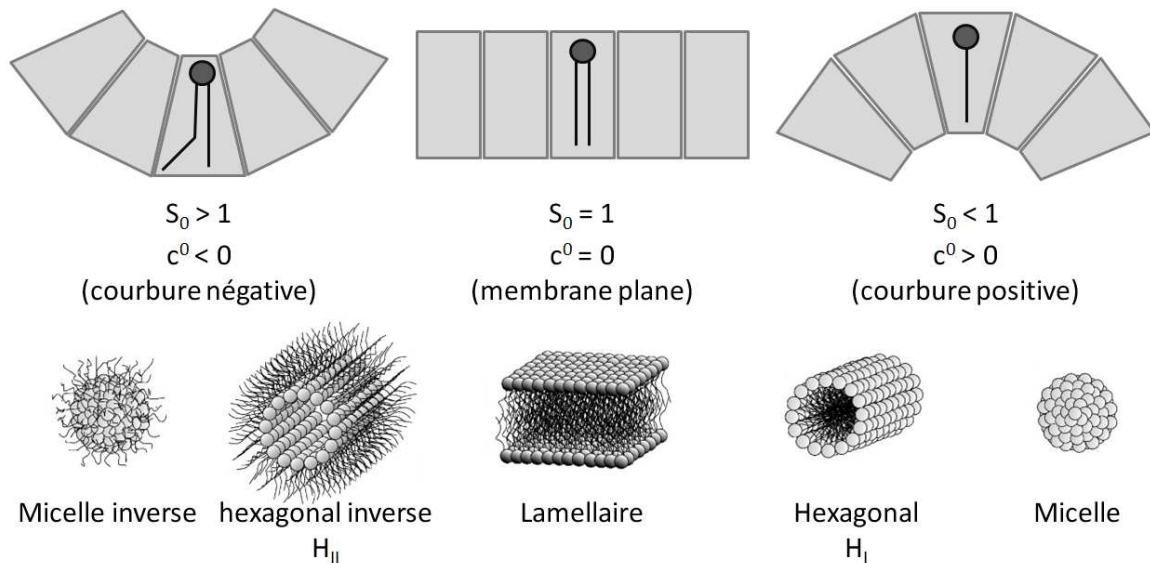


Figure 2-14 : Schéma des structures spontanément formées par des agrégats de phospholipides en fonction du paramètre de *packing*. S_0 ; paramètre de *packing* et c^0 ; courbure spontanée ; tels que définis dans la Figure 2-13.

2.2.3 Le recrutement des protéines périphériques

Les ancres lipidiques

L'ajout d'un groupement hydrophobe sur une protéine permet son ancrage sur les membranes. Nous pouvons distinguer trois types de modification lipidique :

- ajout d'un acide gras (myristoylation et palmitoylation),
- ajout d'un isoprène (prénylation),
- ajout d'un phospholipide (glypiation).

La myristoylation est l'ajout d'un acide myristique (14:0) (Tableau 2-1) à l'extrémité N-terminale sur une glycine par une N-myristoyltransférase (NMT). Cette modification co-translationnelle nécessite le clivage de la méthionine N-terminale.

La palmitoylation est l'ajout d'un acide palmitique (16:0) (Tableau 2-1) sur une cystéine par une liaison thioester hydrolysable. Contrairement à la myristoylation qui est irréversible, la palmitoylation est dynamique, ce qui suggère une régulation de la localisation de ces protéines par un cycle de palmitoylation/dépalmitoylation (catalysé par une palmitoyl-protéine thioestérase).

La prénylation est une modification post-traductionnelle consistant en la fixation d'un groupement prényl sur une protéine ; par la réaction du dérivé pyrophosphate du géranyl (C10), farnésyl (C15) ou géranylgéranyl (C20) (Figure 2-15) avec le groupement sulfhydrile d'une cystéine pour former une liaison thioether (C-S-C).

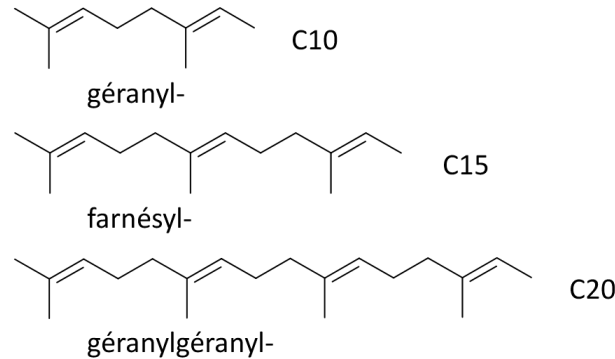


Figure 2-15 : Groupements prényls utilisés lors de la prénylation de protéines. Les groupements prényls sont des terpènes ayant pour origine la polymérisation de l'isoprène.

La prénylation se produit sur une cystéine située à l'extrémité C-terminale de la protéine et incluse dans un motif CaaX où une cystéine est suivie par deux acides aminés aliphatiques (glycine (G), alanine (A), valine (V), leucine (L) ou isoleucine (I)). Le dernier acide aminé permet de spécifier le type de groupement prényl associé. Si X est une méthionine (M), une sérine (S) ou une alanine (A), un groupement farnésyl est ajouté. Lorsque X est une leucine, un groupement géranylgéranyl est ajouté. Généralement, les trois derniers acides aminés sont clivés et l'extrémité carboxyterminale de la cystéine est méthylée par une isoprenylcystéine carboxyl méthyltransférase (ICMT).

La prénylation est catalysée par une farnésyl-transférase ou une géranylgéranyl-transférase de type I. Dans le cas particulier des Rab, la géranylgéranlation est catalysée par une géranylgéranyl-transférase de type II. Cette enzyme ajoute un géranylgéranyl sur les deux cystéines d'un motif C-terminal -CC, -CXC ou -CCXX) [145]. La méthylation de l'extrémité C-terminale n'est pas systématique dans ce cas là.

La prénylation facilite l'ancrage à la membrane des protéines périphériques mais peut aussi jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines *via* des domaines de fixation du groupement prényl. La PrBP/ δ est une protéine chaperonne fixant les protéines prénylées grâce à un domaine de fixation du groupement prényl [146]. De même les GDI ont une poche hydrophobe permettant d'accueillir le groupement géranylgéranyl des Rab.

Glypiation

La *glypiation* est l'attachement sur une protéine d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI) par une réaction de transamination réalisée dans le réticulum endoplasmique. Le GPI est un phosphatidylinositol glycosylé (Figure 2-16). La chaîne de sucres est ajoutée séquentiellement en une dizaine d'étapes dans le réticulum endoplasmique. Les deux premières étapes ont lieu du côté cytosolique. Une *flippase* fait ensuite passer le groupement glucosamine-inositol dans le lumen du réticulum endoplasmique (Figure 2-16 étape (3)) [147]. La

maturation de l'ancre GPI passe par la déacylation de l'inositol dans le réticulum puis la modification de l'acyl en *sn*-2. Les chaînes d'acides gras des GPI matures sont majoritairement insaturées (acide stéarique (18:0)) [148] alors que les PI contiennent un acide stéarique en position *sn*-1 et un acide arachidonique (20:4(n-6)) en position *sn*-2. Enfin, les ancres GPI matures présentent un enrichissement en 1-alkyl-2-acyl-PI sans que cela ait été expliqué.

Les protéines *glypiées* sont exportées à la membrane plasmique et sont exposées au milieu extracellulaire. Les protéines glypiées se regroupent en *nanoclusters* qui peuvent oligomériser en réponse à un signal extracellulaire. Les protéines glypiées sont ensuite internalisées par la voie CLIC (*clathrine independant carriers*) (qui serait contrôlée par Arf1) pour se retrouver dans les GEEC (*GPI-anchored proteins enriched early endosomal compartment*). Les GEEC peuvent être ré-adressés à la membrane *via* la voie de recyclage des endosomes ou être dirigés vers les lysosomes pour être dégradés [148].

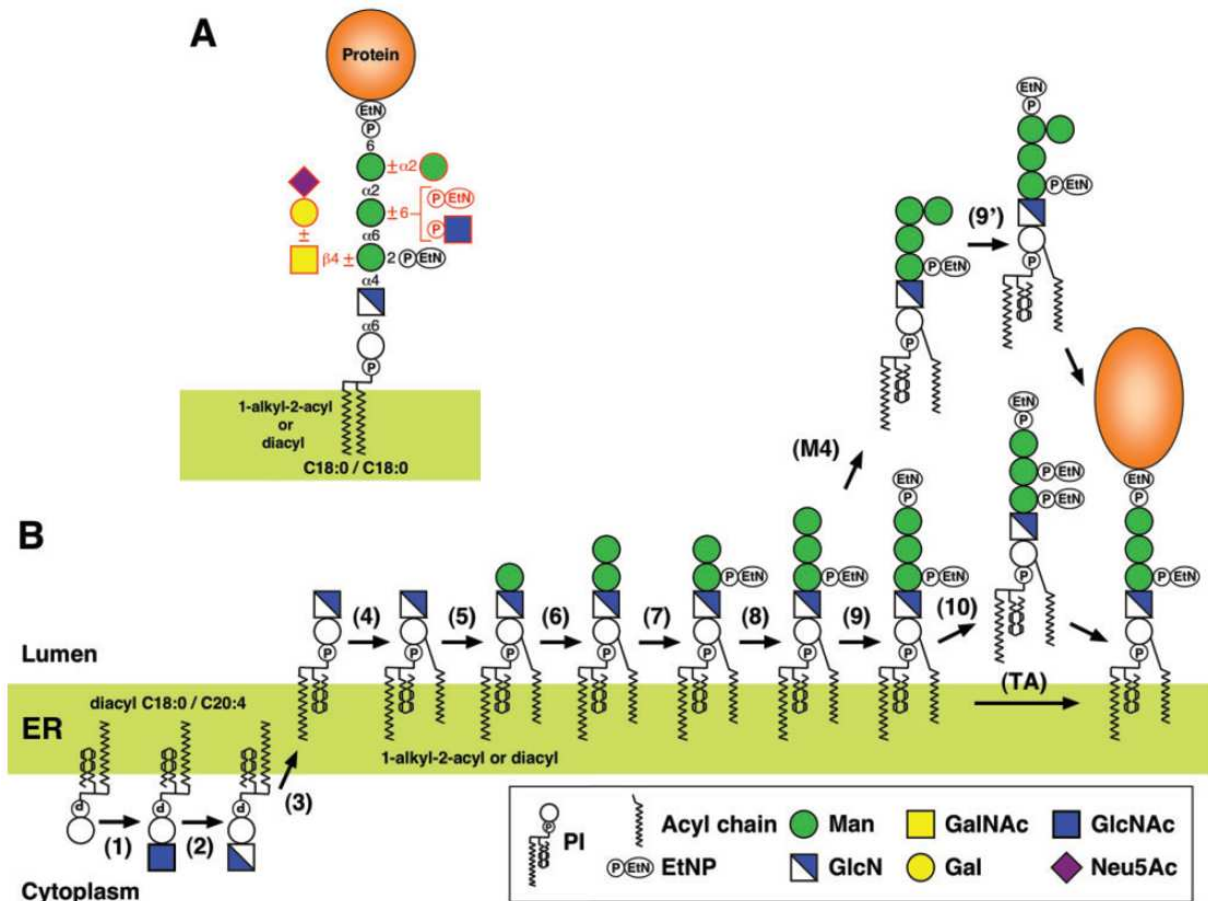


Figure 2-16 : Biosynthèse des ancres GPI (modifié d'après [147]). La première étape est l'ajout d'un N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur un phosphatidylinositol (PI) sur la face cytosolique du réticulum. Les étapes suivantes sont réalisées dans le lumen du réticulum. Le précurseur complet de l'ancre GPI est ensuite pris en charge par une transaminidase (TA) qui catalyse l'attachement du précurseur GPI sur la protéine immature. GlcN : glucosamine ; Man : mannose ; GalNAc : N-acétylgalactosamine ; Gal : galactose ; EtNP : éthanolamine-phosphate ; Neu5Ac : acide N-acétylneuraminique ; ER : réticulum endoplasmique

Les hélices amphipatiques, ancres protéiques

Les hélices amphipatiques sont des structures en hélice alpha particulières et prévisibles à partir de la séquence primaire des protéines. Par exemple, le logiciel Heliquet (heliquet.ipmc.cnrs.fr) [149] permet de calculer la propension d'une séquence à former une hélice amphipatique. Le moment amphipatique d'une hélice caractérise la force de son amphipaticité.

Une hélice amphipatique est caractérisée par une concentration d'acides aminés hydrophobes (par ordre de taille : alanine (A), valine (V), leucine (L), isoleucine (I), phénylalanine (F) ou tryptophane (W)) créant une face hydrophobe. Inversement la face opposée dite polaire présente une concentration d'acides aminés polaires (asparagine (N), glutamine (Q), serine (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y)) pouvant être chargés négativement (acide aspartique (D) ou acide glutamique (E)). A l'interface entre les deux faces de l'hélice se trouvent des résidus chargés positivement (lysine (K) ou arginine (R)). Les prolines ne sont en général pas retrouvées dans les hélices alpha en raison de leur structure rigide. Ainsi l'hélice amphipatique est une structure amphiphile plus ou moins parfaite (Figure 2-17).

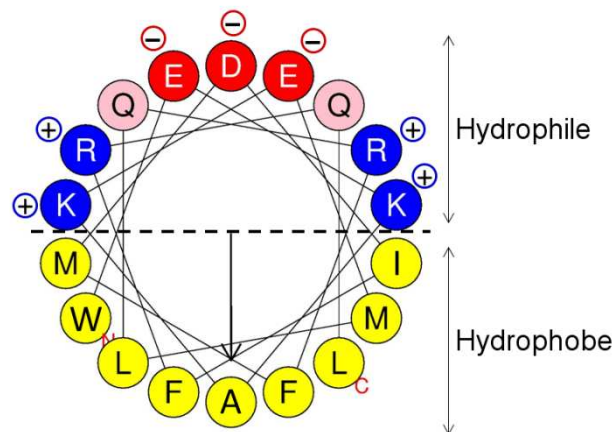


Figure 2-17 : Représentation en roue d'une hélice amphipatique synthétique. Les acides aminés de la face hydrophobe sont indiqués en jaune, les acides aminés polaires sont en rose, les acides aminés polaires chargés négativement sont en rouge et chargés positivement en bleu. La flèche indique le moment amphipatique (Heliquet).

Une hélice amphipatique membranaire est insérée dans la moitié d'un feuillet de la membrane grâce aux interactions hydrophobes entre la face hydrophobe et les chaînes d'acide gras des phospholipides. Les résidus chargés positivement à l'interface sont en contact avec les groupements phosphate et les résidus polaires et chargés négativement sont exposés au solvant (Figure 2-18).

Les hélices amphipatiques sont en interaction avec les chaînes d'acides gras, le phosphate et les groupements polaires. Récemment notre équipe a montré que l'insertion d'une hélice amphipatique débute par l'insertion des résidus hydrophobes de la face hydrophobe dans les défauts de *packing* [150]. La stabilisation induite de ces défauts de *packing* permet de soulager une partie du stress membranaire.

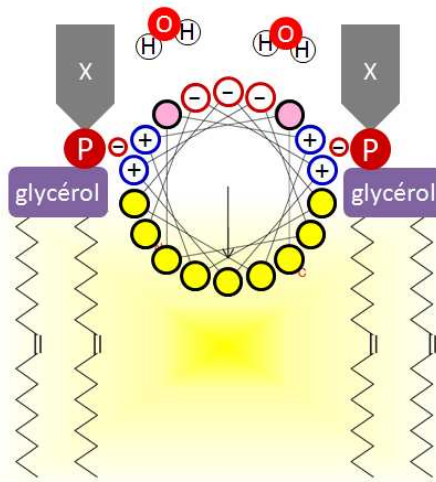


Figure 2-18 : Schéma du principe d'insertion d'une hélice amphipatique dans une membrane biologique.

2.2.4 Les radeaux lipidiques, mythe ou réalité ?

Dans une membrane artificielle composée de deux lipides de température de fusion différente et d'un stérol, les lipides se ségrègent en deux phases, en fonction de la température et de la composition (Figure 2-19) [131], [151] :

- une phase l_o (*liquid ordered phase*) enrichie en stérol et phospholipide à haute température de fusion, caractérisée par une fluidité réduite,
- une phase l_d (*liquid disordered phase*) enrichie en phospholipide à basse température de fusion, caractérisée par une moindre structuration.

D'un point de vue physico-chimique, la formation de ces deux phases est possible, voire favorable, dès que plusieurs lipides sont en présence. La coexistence de plusieurs lipides génère une tension de membrane, en partie minimisée par le regroupement des lipides selon leur affinité.

En réalité, les membranes biologiques semblent homogènes et des différences de phase sont difficiles à mettre en évidence sans en perturber l'équilibre. La purification de membranes résistantes au détergent (DRM, *detergent resistant membranes*) a été à l'origine du concept des « radeaux lipidiques ». Les *radeaux lipidiques* seraient des domaines membranaires en phase l_o , stables, et enrichis en cholestérol et en protéines à ancre GPI. Les *radeaux lipidiques* seraient impliqués dans de nombreux processus cellulaires.

Cependant, de plus en plus d'observations contradictoires semblent indiquer que le concept des *radeaux lipidiques* n'est pas applicable à la cellule vivante [152], [153]. La purification des DRM est réalisée à basse température. Or la partition des lipides dans les phases l_o ou l_d dépend de la température. Ainsi, il est possible que la diminution de la température favorise ou induise la formation des DRM. Ainsi, les DRM ne sont pas des *radeaux lipidiques*. Ensuite, l'observation *in vivo* des protéines supposées être associées aux *radeaux lipidiques* indique une localisation aléatoire et une dynamique non compatible avec le concept des *radeaux lipidiques*. Ces observations indiquent que les *radeaux lipidiques* ne préexistent pas dans la membrane plasmique.

Le concept des *radeaux lipidiques* a évolué vers celui des *microdomaines membranaires*. Les microdomaines membranaires sont des structurations protéolipidiques de la membrane, dynamiques, induites par un stimulus, et entraînant une réponse cellulaire. *In vivo* les microdomaines peuvent être visualisés par les sondes laurdan dont la réponse spectrale dépend de l'environnement lipidique. Ses sondes sont sensibles à un changement de phase dans la membrane.

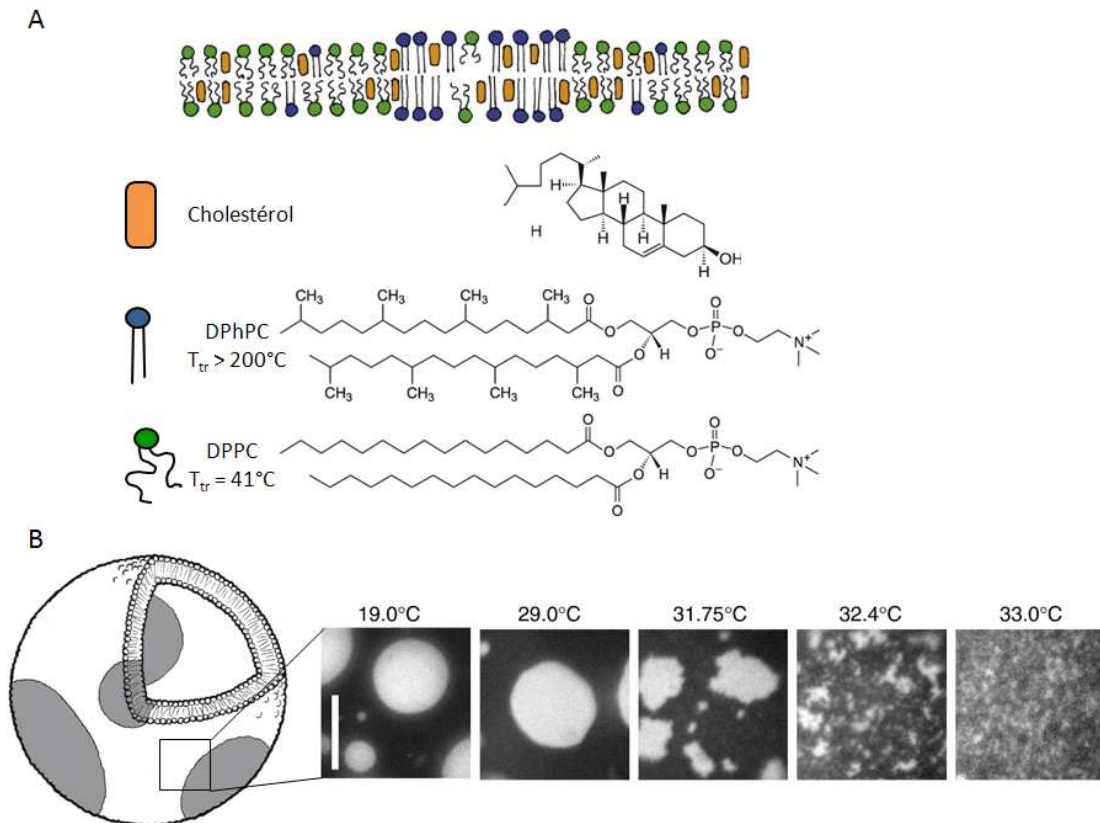


Figure 2-19 : Comportement d'un mélange de lipides en fonction de la température [151]. (A) Composition d'une membrane à trois lipides : 55 mol% cholestérol, 25 mol% lipide à haute température de fusion (diphytanoyl phosphatidylcholine, DPhPC) et 20 mol% lipide à base température de fusion (dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC). (B) Observation d'une section d'un liposome (GUV, *giant unilamellar liposome*) en fonction de la température.

L'existence des domaines lipidiques est-il un pré requis pour la formation de complexes protéiques ou l'assemblage des complexes permet-il de former des agrégats lipidiques ? De même, les mécanismes biologiques et physico chimiques mis en œuvre ne sont pas encore clairement compris. La formation de microdomaines est thermodynamiquement possible et favorable dans certaines conditions de température, de pression et de composition. Des processus biologiques actifs (nécessitant de l'ATP) permettraient de stabiliser cette structuration particulière de la membrane plasmique. Le dialogue entre les lipides et les protéines à l'origine de ces domaines membranaires n'est pas encore déchiffré et nécessite la mise au point de nouveaux outils.

2.3 Le métabolisme des acides gras

Les lipides sont des éléments constitutifs essentiels de la cellule car ils entrent dans la composition des membranes. Ainsi, les voies biochimiques de leur métabolisme sont conservées chez la majorité des êtres vivants (biosynthèse et oxydation des lipides).

2.3.1 La biosynthèse des acides gras

Le précurseur est l'acétyl-CoA

La plupart des acides gras ont un nombre pair d'atomes de carbone. Ceci est expliqué par la biosynthèse des acides gras par condensation d'acétyl-CoA (Figure 2-20). Toutes les cellules ont la capacité de synthétiser des acides gras et les voies métaboliques mises en jeu sont similaires. Cependant, les enzymes impliquées ont divergé (Tableau 2-4). Dans les cellules animales, l'acétyl-CoA provient principalement de la dégradation des glucides alimentaires (voie de la glycolyse). Ainsi, l'excédent alimentaire est rapidement converti en acide gras et stocké sous forme de triacylglycérol dans les cellules adipeuses (adipocytes). Dans les cellules végétales, l'acétyl-CoA provient de la photosynthèse.

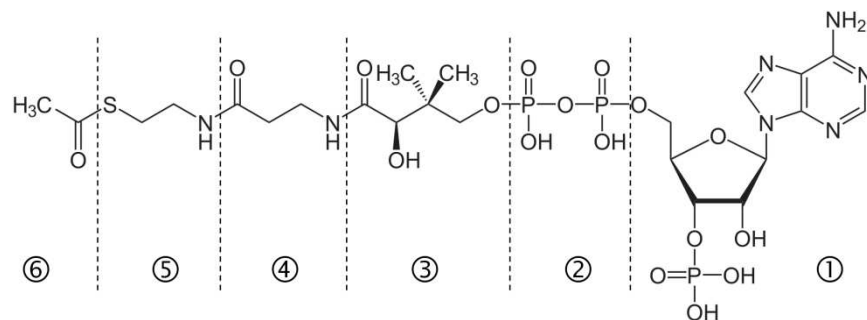


Figure 2-20 : Structure de l'acétylcoenzyme A (CoA). (1) adénosine (2) pyrophosphate (3) acide pantoïque (4) β-alanine (3+4) acide pantothénique (5) cystéamine (2-aminoéthanthiol) (6) acétyl.

Synthèse de novo

La biosynthèse des acide gras nécessite deux complexes multienzymatiques : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et l'acide gras synthétase (FAS, *fatty acid synthase*).

Tableau 2-4 : Structures des enzymes de la synthèse des acides gras selon le règne.

		ACC	FAS
PROCARYOTES	Bactéries (<i>E. coli</i>)	Complexe multiprotéique	Plusieurs enzymes
		Complexe multiprotéique dans les chloroplastes	Plusieurs enzymes dans les chloroplastes
EUCARYOTES	Plantes	Protéine multifonctionnelle dans le cytosol	
	Levures	Protéine multifonctionnelle	Protéine multifonctionnelle
	Cellules animales	Protéine multifonctionnelle	Protéine multifonctionnelle

Les différentes étapes sont catalysées par une enzyme au sein d'un complexe multiprotéique (procaryote) ou par une protéine multifonctionnelle (eucaryote)

(Tableau 2-4). La première étape catalysée par l'ACC est la carboxylation biotine dépendante (ajout d'un carbone) de l'acétyl-CoA pour former le malonyl-CoA. Le coenzyme A est ensuite échangé avec une protéine de 8,8 kDa (acyl carrier protein, ACP) qui restera attachée à l'acide gras naissant pendant tout le processus de synthèse. Le malonyl-ACP est ensuite condensé par la FAS avec un acétyl-ACP à n carbones pour former un 3-cétoacyl-ACP à $n+2$ carbones (Figure 2-21). La fonction cétone en position 3 est ensuite éliminée en trois étapes (réduction de la cétone, déshydratation de l'alcool, et réduction de l'alcène) pour former un acyl-ACP saturé à $n+2$ carbones (Figure 2-21). L'acyl-ACP est ensuite de nouveau condensé avec un malonyl-ACP par la FAS pour allonger la chaîne d'acide gras (phase d'élongation) [154].

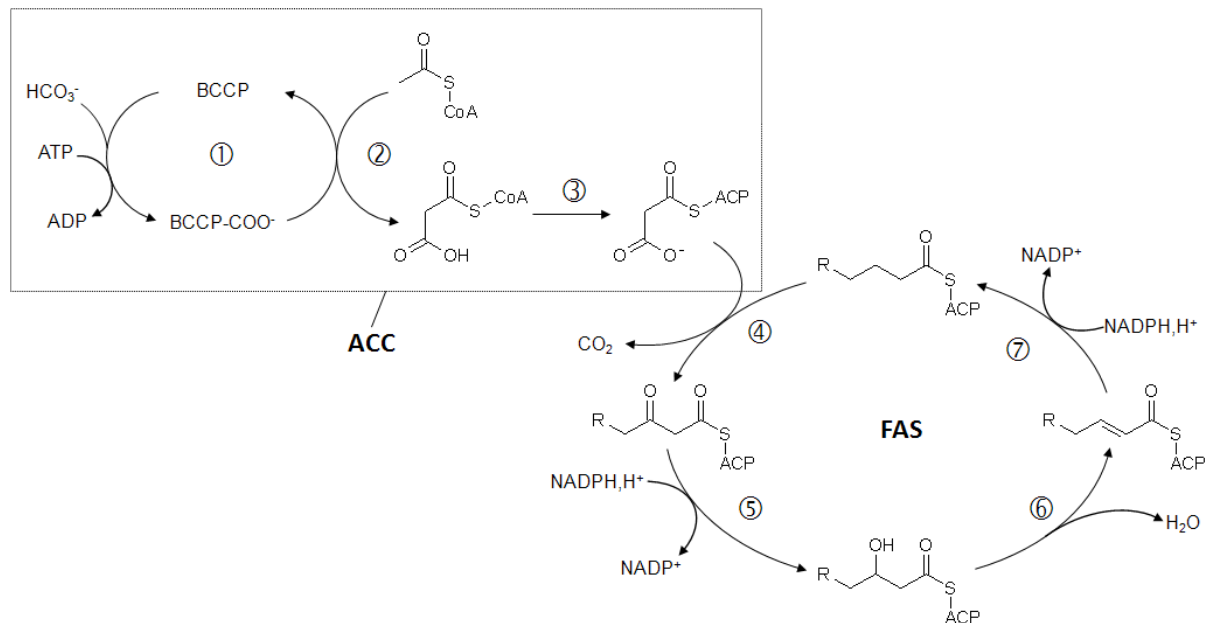


Figure 2-21 : Synthèse des acides gras *de novo*. (1) Activation de la biotine (BCCP) (2) carboxylation de l'acétyl-CoA pour former le malonyl-CoA (3) échange du coenzyme A par l'ACP par une transférase (4) condensation du malonyl-ACP sur la chaîne naissante d'acide gras ($n+2$ carbones) (5) réduction de la fonction cétone en C3 (6) déshydratation de l'alcool pour former l'alcène correspondant (7) réduction de la fonction alcène en alcane. Les étapes 4 à 8 forment un cycle permettant l'allongement de la chaîne d'acide gras par ajout successif de 2 carbones. ACC = acétyl-CoA carboxylase ; ACP = *acyl carrier protein* ; BCCP = biotine cofacteur ; FAS = *fatty acid synthase*.

L'activité des complexes ACC et FAS conduit dans la plupart des cellules à la néosynthèse d'un acide gras saturé à 16 carbones (palmitate) à partir de précurseurs à deux carbones issus du catabolisme des glucides ou de la photosynthèse. L'acide gras est ensuite libéré de l'ACP par une thioesterase qui hydrolyse la liaison thioester entre l'acide gras et l'ACP.

Modification des acides gras

Le palmitate n'est souvent pas l'acide gras majoritaire, il subit ensuite des modifications : branchement, hydroxylation ou insaturation(s).

Branchement et hydroxylation

Le branchement des acides gras est un processus spécifique à certaines espèces. La formation d'acides gras branchés dépend du précurseur utilisé. Ainsi

dans la plupart des cellules, l'utilisation d'un méthylmalonyl-CoA au lieu du malonyl-CoA par l'ACC induit des branchements qui sont rapidement décarboxylés. Chez certaines espèces, cependant, ce méthyle n'est pas éliminé (tissus adipeux des ovins et caprins par exemple).

Certaines espèces bactériennes utilisent la leucine ou l'isoleucine comme donneur de carbone ce qui induit la présence d'un groupement méthyle sur l'acide gras résultant. Enfin, les *Mycobacterium* peuvent méthyler la chaîne d'acide gras des phospholipides insérés dans la membrane.

Les acides gras hydroxylés sont des intermédiaires des voies métaboliques (par exemple l'étape 5 de la synthèse des acides gras, Figure 2-21).

Monoinsaturation

Les acide gras monoinsaturés composent plus de la moitié des acide gras d'une cellule en condition basale. Un défaut dans la voie de désaturation des acides gras a été impliqué dans de nombreuses pathologies comme le diabète, l'obésité, l'hypertension, dans certains cancers ainsi que dans certaines maladies neurologiques. Ainsi, la synthèse des acides gras monoinsaturés est soumise à une régulation [155].

La monoinsaturation des acides gras est réalisée dans la membrane du réticulum endoplasmique par la SCD (stéaroly-CoA desaturase). L'oxydation à la position 9 nécessite l'intervention du cytochrome b_5 , de la réductase du cytochrome b_5 dépendante du NADPH et de d'oxygène moléculaire (O_2) (Figure 2-22) [156]. La SCD peut indifféremment utiliser le palmitoyl-CoA ou le stéaroyl-CoA pour générer les acides gras monoinsaturés correspondants (l'acide palmitoléique ou l'acide oléique respectivement) [155].

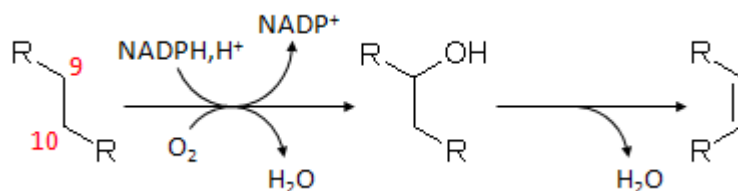


Figure 2-22 : Principe de la réaction de désaturation des acide gras par la SCD [155].

Polyinsaturations

La synthèse des acide gras polyinsaturés peut se faire selon deux stratégies différentes, à partir d'un acide gras monoinsaturé en position 9 (Δ^9 ou $\omega-9$) [157]:

1. La désaturation *front end* consiste à introduire une double liaison entre l'insaturation existante et l'extrémité carboxyle ;
2. La désaturation *methy end* consiste à introduire une insaturation sur l'extrémité CH₃ de l'acide gras.

Tous les eucaryotes peuvent synthétiser des acides gras polyinsaturés par *front end*. Les acides gras polyinsaturés sont produits par oxydation à partir d'oxygène moléculaire sous l'action de *désaturases*. Les désaturases sont spécifiques d'une position le long de la chaîne d'acide gras [158], [159]. Par exemple la Δ^6 -desaturase permet d'introduire une insaturation sur la position 6 (comptée à partir du carbone C₁ portant la fonction acide carboxylique). Les désaturases peuvent aussi être spécifiques d'un acide gras particulier ou d'une position particulière des diacylglycérols. Les Δ^5 -desaturase et Δ^6 -desaturase sont spécifiques

de la position *sn*-2 de la phosphatidylcholine [160]. L'action successive des désaturases et d'élongases (enzymes permettant de rajouter 2 carbones à partir de l'acétyl-CoA sur un acide gras) permet de former des acides gras polyinsaturés à longue chaîne [160–162].

La désaturation *methyl end* n'est réalisée que chez certains organismes, en particulier les plantes. Cette voie permet de synthétiser les acides gras essentiels qui ne sont pas synthétisés par les mammifères (oméga-6 et oméga-3). Cette désaturation est réalisée par le FAD2 (*fatty acid desaturation*) qui est une ω -6 oléate désaturase permettant de former l'acide linoléique (18:2(n-6)) à partir de l'acide oléique sur la position *sn*-2 de la phosphatidylcholine [163], [164]. La FAD3 est une ω -3 linoléate désaturase permettant de former l'acide α -linoléique (18:3(n-3)) à partir de l'acide linoléique sur la position *sn*-2 de la phosphatidylcholine [164], [165].

Les désaturases sont des enzymes microsomales localisées sur le réticulum endoplasmique ou dans les plastes. La réaction d'oxydation permettant d'introduire une insaturation est couplée au cytochrome b5. L'extrémité N-terminale des désaturases *front end* est homologue au cytochrome b5 ce qui permet de coupler efficacement l'oxydation des acides gras et la réduction du cofacteur nicotinique [166].

2.3.2 L'énergie des acides gras

La dégradation des acides gras permet à la cellule de récupérer de grandes quantités d'énergie sous forme de cofacteur réduit ou d'ATP. Dans les cellules eucaryotes, cette voie biochimique a lieu dans le peroxysome pour les acides gras d'origine exogène endocytés ou dans la mitochondrie.

La spirale de Lynen

La première étape de l'oxydation catabolique des acides gras est l'activation de l'acide gras par le CoA. Cette réaction est catalysée par une acyl-CoA synthétase mitochondriale ou peroxysomale [167], [168].

Dans la cellule eucaryote, le catabolisme des acides gras est assuré par la spirale de Lynen ou β -oxydation (Figure 2-23). A chaque tour de spirale, deux carbones sont éliminés sous forme d'acétyl-CoA. Il faut donc $\frac{n}{2} - 1$ tours pour oxyder complètement un acide gras à n carbones sous forme de $\frac{n}{2}$ acétyl-CoA, $\frac{n}{2} - 1$ FADH₂ et $\frac{n}{2} - 1$ NADPH, H⁺.

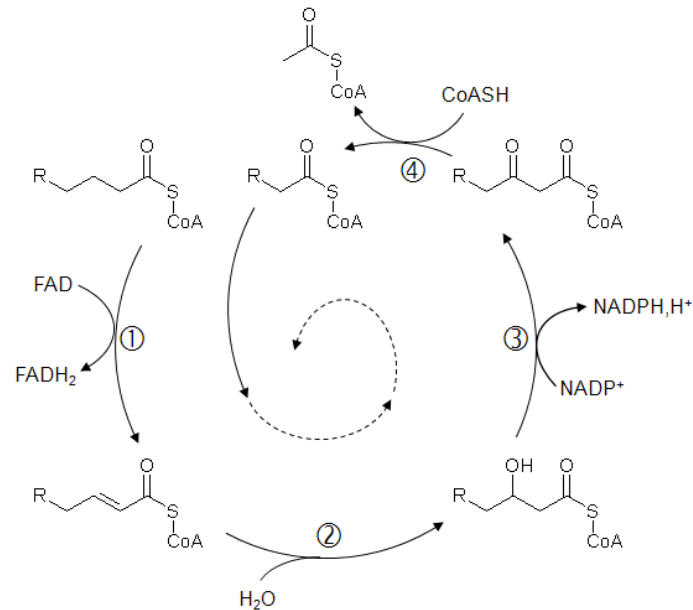


Figure 2-23 : Spirale de Lynen ou β -oxydation des acides gras (n carbones). (1) oxydation du carbone β (2) hydratation de l'alcène (3) oxydation d'un alcool (4) thiolysé pour former un acétyl-CoA et un acyl-CoA à n-2 carbones qui subit un nouveau tour de la spirale de Lynen.

Bilan énergétique de la β -oxydation des acides gras

La β -oxydation d'une mole d'acide palmitique (16:0) permet de générer huit moles d'acétyl-CoA qui sont ensuite oxydées en carbone inorganique (CO_2) dans le cycle de Krebs. L'oxydation complète d'une mole d'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs permet de générer des cofacteurs réduits (trois moles de NADH, H^+ et une mole de FADH_2) et une mole de GTP (Tableau 2-5). L'oxydation d'une mole d'acide palmitique permet donc de réduire 31 moles de NADH, H^+ et 15 moles de FADH_2 . Ces cofacteurs réduits sont ensuite réoxydés grâce à la chaîne de phosphorylation oxydative au niveau de la membrane interne des mitochondries permettant une production massive d'ATP par l'*ATP synthétase*. En effet la réoxydation d'une mole de NADH, H^+ permet de synthétiser trois moles d'ATP et la réoxydation d'une mole de FADH_2 permet de synthétiser deux moles d'ATP. Ainsi le bilan énergétique du catabolisme d'une mole d'acide palmitique est de 131 moles d'ATP. Par comparaison, le catabolisme oxydatif d'une mole de glucose ne permet de fournir « que » 38 moles d'ATP.

Tableau 2-5 : Bilan des voies cataboliques de dégradation des acides gras.

Spirale de Lypen (bilan en mol/mol d'acide gras)			
	Acétyl-CoA	NAPH,H ⁺	FADH ₂
16:0	8	7	7
18:0	9	8	8
Cycle de Krebs (bilan en mol/mol d'acétyl-CoA)			
	NAPH,H ⁺	FADH ₂	GTP
Acétyl-CoA	3	1	1
Chaîne respiratoire (bilan en mol/mol de cofacteur réduit)			
	ATP		
NADH,H ⁺	3		
FADH ₂	2		

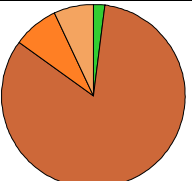
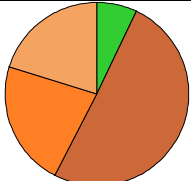
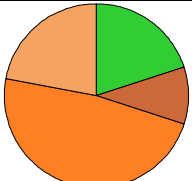
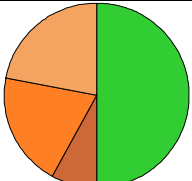
2.3.3 Le transport intercellulaire des lipides

Les lipides sont une source d'énergie importante apportée par l'alimentation. Les lipides sont absorbés de façon efficace par le système digestif et circulent dans le sang, chez l'Homme, sous forme d'agrégats lipo-protéiques appelés lipoparticules (ou lipoprotéines).

Chez l'Homme, les lipoparticules peuvent être classées selon leur densité, directement corrélée au rapport lipide/protéine (Tableau 2-6). Les chylomicrons sont les plus grosses particules, elles peuvent atteindre 1 µm de diamètre. Étant principalement composées de triacylglycérols, ces particules sont aussi les moins denses. Les HDL (*high density lipoparticles*) comportent environ 50% de protéines et 50% de lipides, et sont les lipoprotéines les plus denses.

Les lipoparticules sont formées d'un cœur de lipides neutres (esters de cholestérol et triacylglycérols en proportion variable) (Tableau 2-6), d'une couche de lipides amphiphiles (PC et cholestérol) et d'apoprotéines. Il existe cinq classes d'apoprotéines : A, B, C, D et E. L'apoprotéine B (apoB) est la protéine structurale des lipoparticules. L'apoC permet de réguler la lipolyse des lipoparticules et l'apoE permet l'internalisation en se fixant sur des récepteurs spécifiques.

Tableau 2-6 : Composition et caractéristique des lipoprotéines du plasma humain.

	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
<div> <div></div> Protéines <div></div> TAG <div></div> Cholestérol <div></div> Phospholipides </div>				
Masse (MDa)	0,4 - 30	10 - 100	2 - 3,5	1,75 - 3,6
Densité (g/mL)	<0,95	0,95 - 1,006	1,019 - 1,063	1,063 - 1,210
Diamètre (nm)	80 - 1000	30 - 90	18 - 22	5 - 12
Apolipoprotéines	AI, AII, AIV, B-48, CI, CII, CIII, E	B-100, CI, CII, CIII, E	B-100	AI, AII, AIV, CI, CII, CIII, D, E

TAG : triacylglycérols

 LDL : *low density lipoparticle* (lipoparticules à faible densité)

 VLDL : *very low density lipoparticles* (lipoparticules à très faible densité)

 HDL : *high density lipoparticle* (lipoparticules à haute densité)

La voie endogène

Plus de 90% des lipides sont apportés sous forme de triacylglycérols par les huiles et graisses alimentaires. Le système digestif des mammifères est très efficace pour absorber les lipides du bol alimentaire. Les lipides alimentaires sont hydrolysés en leur constituants de base (acides gras libres, monoacylglycérols, cholestérol libre, lisophosphatidylcholine) par des lipases acides, sécrétées dans l'estomac [169]. Ces lipides sont ensuite complexés sous forme de micelles avec les acides biliaires (acides dérivés du cholestérol) dans l'intestin pour faciliter leur absorption au niveau des entérocytes (Figure 2-24). Les acides gras, les monoacylglycérols et le lisophosphatidylcholine diffusent librement au travers de la membrane apicale des entérocytes [170], [171]. Cependant, des transporteurs actifs de la famille des transporteur ABC, ATP dépendants (ABCG5 et ABCG8) sont impliqués dans l'absorption du cholestérol [169], [170].

Les acides gras sont ré-estérifiés dans le réticulum par la voie de la synthèse des monoacylglycérols par des monoacylglycérol acyltransférases (MGAT). La protéine DGAT2 (cf. 2.1.4 ci-dessus) permet ensuite de former des triacylglycérols dans le réticulum endoplasmique (Figure 2-24). Près de 80% du cholestérol absorbé est ainsi estérifié dans le réticulum endoplasmique par une acyl-CoA:cholestérol acyltransférase (ACAT).

La synthèse des chylomicrons est effectuée uniquement par les entérocytes et permet le transport et la distribution des lipides alimentaires. La synthèse des chylomicrons commence dans le réticulum endoplasmique par la traduction de la protéine apoB-48 (ARNm épissé ne comprenant que les 48% N-terminaux de l'apoB-100). L'apoB-48 est ensuite rapidement transférée dans le réticulum endoplasmique lisse où elle est chargée en triacylglycérols pour former un chylomicron naissant. Le transport des chylomicrons naissants du réticulum endoplasmique vers le Golgi se fait dans une vésicule contenant une unique lipoparticule (PCTV, *pre-chylomicrons transport vesicle*). Le PCTV bourgeonne à partir du réticulum lisse grâce à l'action de la petite protéine G Sar1 qui recrute le manteau COPII. L'adressage au Golgi serait assuré par la présence de la SNARE VAMP-7 [172–174]. Le transporteur microsomal des triacylglycérols (MTP, *microsomal triglyceride transport protein*) associé au réticulum et au Golgi va charger en triacylglycérols le cœur du chylomicron. Dans le Golgi, les chylomicrons sont maturés par glycosylation et association avec les autres apoprotéines. Les chylomicrons matures sécrétés par les entérocytes contiennent apoB-48 ainsi que apoC et apoE.

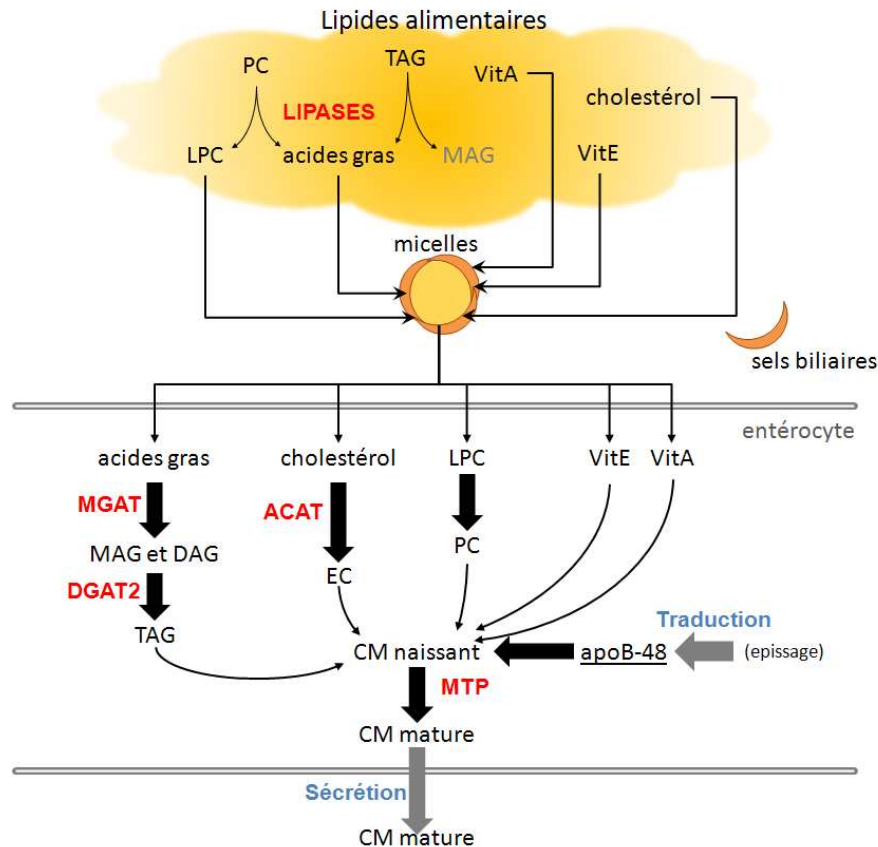


Figure 2-24 : Absorption des lipides alimentaires par l'entérocyte (cellule intestinale). Les lipides issus de l'alimentation sont hydrolysés en acides gras, monoacylglycérols (MAG) et cholestérol par les enzymes stomacales, puis agrégés sous forme de micelles avec les sels biliaires sécrétés par le foie via la vésicule biliaire. Ces micelles facilitent l'absorption des lipides par les entérocytes. Les lipides entrent dans la cellule par simple diffusion ou par l'action d'un transporteur spécifique. Les enzymes du réticulum endoplasmique vont ensuite reformer les esters de cholestérol (EC) et des triacylglycérols (TAG) qui sont incorporés dans les chylomicrons (CM). Les CM sont des agrégats amorphes constitués d'un cœur de TAG et d'EC entourés d'une monocouche de phospholipides (principalement phosphatidylcholine, PC) et de cholestérol à laquelle est associée la protéine apoB-48. Les CM sont transportés dans le Golgi où la protéine microsomale de transport des triacylglycérols (MTP, *microsomal triglycerid transport protein*) charge l'apoB-48 en TAG. Les CM sont ensuite sécrétés dans la circulation générale vers le foie et les tissus.

Les chylomicrons distribuent au foie et aux organes consommateurs d'acides gras, les lipides alimentaires. Dans les capillaires, les lipoprotéines lipases associées à l'endothélium (LPL), activées par l'apoC, hydrolysent les triacylglycérols pour libérer des acides gras qui sont utilisés comme source d'énergie par les cellules musculaires ou stockés dans les adipocytes [175]. Les chylomicrons vont progressivement perdre leur contenu en acide gras pour former des *rémanents* contenant des esters du cholestérol, des phospholipides (PC), apoB-48, et apoE. Les rémanents sont absorbés par les cellules hépatiques pour être dégradés dans les lysosomes en cholestérol et acides gras. Le cholestérol sert, entre autres, à la synthèse des sels biliaires, évacués vers la vésicule biliaire.

Le métabolisme des lipoparticules

Les HDL sécrétées par le foie contiennent l'apoprotéine A, E et C. Dans la circulation, les rémanents de chylomicrons et de LDL forment des HDL. Contrairement aux HDL hépatiques, les rémanents ne contiennent pas l'apoE mais

sont enrichis en ester de cholestérol. La LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase) plasmatique estérifie le cholestérol présent à la surface des HDL. Les esters de cholestérol sont ensuite internalisés au cœur des HDL permettant à la surface de capter le cholestérol libre en excès sur les surfaces des cellules et dans le plasma. Les HDL sont ensuite internalisés par le foie grâce à des récepteurs de l'apoE. La dégradation lysosomale des HDL permet un recyclage des composants (acide aminés, acides gras et cholestérol).

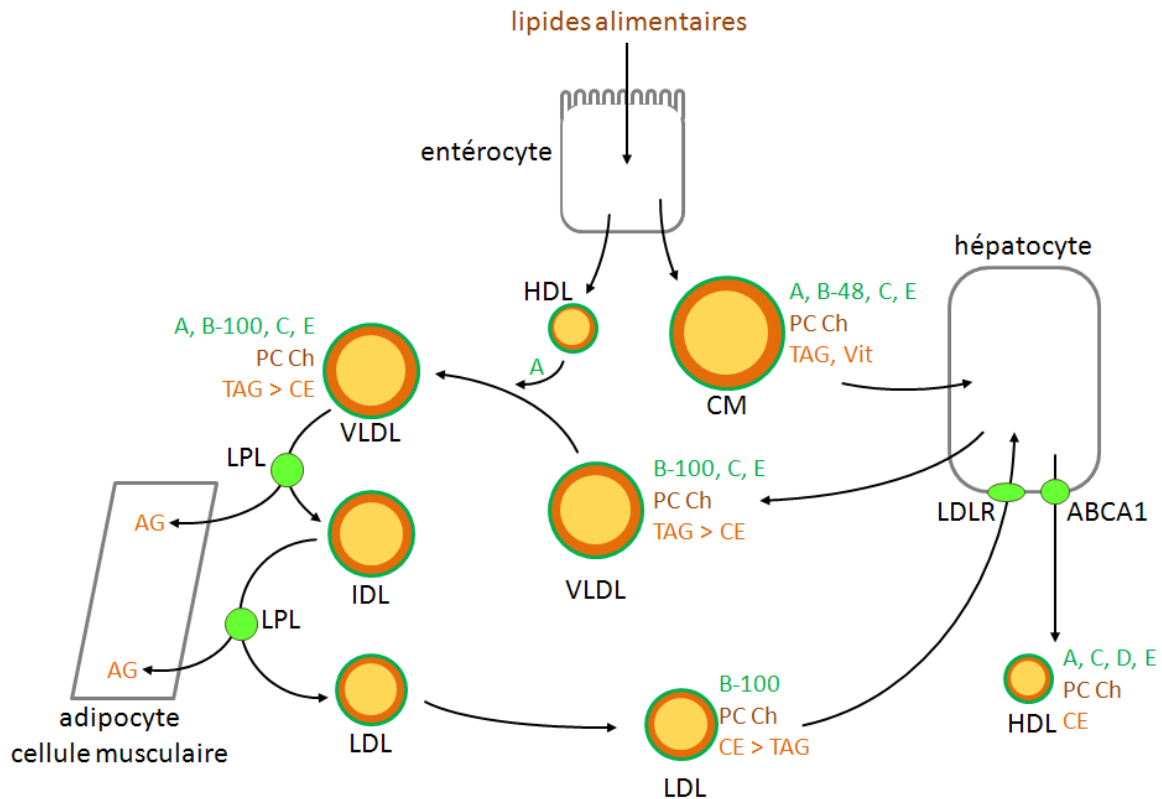


Figure 2-25 : Métabolisme plasmatique des lipoparticules. Les chylomicrons (CM) sont sécrétés par les entérocytes à partir de l'absorption des lipides alimentaires. Les hépatocytes récupèrent les lipides des chylomicrons et sécrètent des VLDL immatures et des HDL [176]. Dans le plasma, les VLDL récupèrent l'apoA sur les HDL puis distribuent leur contenu en acides gras (AG) lors de leur passage à proximité des cellules consommatrices d'AG (cellules musculaires ou adipocytes par exemple). Les lipoprotéines lipases (LPL) sont activées par l'apoC. La perte progressive des AG des VLDL provoque une augmentation relative de leur contenu protéique et donc de leur densité pour former des LDL qui ne contiennent presque plus de triacylglycérols (TAG). Les LDL enrichies en esters de cholestérol (CE) retournent aux hépatocytes *via* les récepteurs des LDL (LDLR). En vert sont indiquées les apoprotéines présentes sur les lipoparticules, en brun les lipides amphiphiles formant la couche externe et en orange les lipides neutres formant le cœur des lipoparticules. PC : phosphatidylcholine ; Ch : cholestérol ; Vit : vitamines liposolubles (A, E et K) ; IDL : *intermediate density lipoparticules* (lipoparticule à densité intermédiaire).

Les VLDL sont riches en triacylglycérols et captent l'apoA des HDL. Comme pour les chylomicrons, les triacylglycérols contenus dans les VLDL sont progressivement hydrolysés dans les capillaires des muscles et du tissu adipeux. La perte d'acides gras permet la transformation progressive des VLDL en LDL. L'oxydation des LDL est un facteur de risque important de l'athérosclérose [177], [178]. L'oxydation de l'apoB-100 des LDL induit leur phagocytose par les macrophages circulants qui deviennent des *cellules spumeuses* (macrophage gonflé de gouttelettes lipidiques) à l'origine du dépôt des plaques d'athérome [179], [180].

Les hépatocytes sont responsables de la synthèse et de la sécrétion des VLDL permettant de redistribuer les acides gras et le cholestérol aux cellules de l'organisme. Les acides gras utilisés pour la synthèse des VLDL proviennent de l'internalisation et de la dégradation des rémanents de lipoparticules, d'acides gras alimentaires (*via* la veine porte) et du stock contenu dans les gouttelettes lipidiques (mobilisation des ressources). La synthèse des VLDL commence dans le réticulum endoplasmique. L'apoB-100 est une large glycoprotéine amphipatique de plus de 515 kDa qui est cotraductionnellement lipidée grâce à la MTP pour former une lipoparticule primordiale (Figure 2-26) [181–183]. En cas de carence lipidique, apoB n'est pas lipidée et est dégradée (voie ERAD). Les lipoparticules primordiales faiblement lipidées sont ensuite transportées dans le Golgi dans des vésicules de transport spécifiques aux VLDL (VTV, *VLDL transport vesicles*). Les VTV sont formées au niveau des ERES par la voie Sar1-COPII [181], [184]. Cependant, les VTV sont plus larges qu'une vésicule de transport classique et ne comportent qu'une seule lipoparticule (Figure 2-26). Les VTV possèdent la v-SNARE Sec22b qui permet leur adressage au *cis*-Golgi. Dans le Golgi, apoB sera glycosylée [185], phosphorylée et lipidée [182], [186] et la VLDL acquiert d'autres apoprotéines (apoA, C et E) afin de former une VLDL mature qui est sécrétée [181] par des vésicules de transport spécifiques.

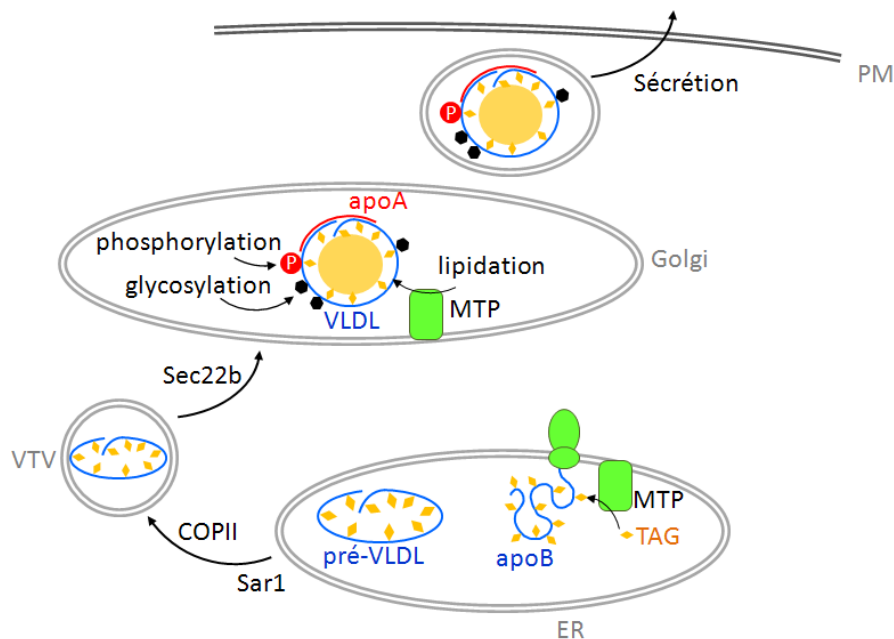


Figure 2-26 : Synthèse des VLDL dans les hépatocytes. Dans le réticulum endoplasmique (ER), apoB est cotraductionnellement lipidée par MTP. Le VLDL primordial (pré-VLDL) est ensuite transporté dans une vésicule dédiée (VTV) formée par bourgeonnement de Sar1-COPII. Dans le Golgi, la pré-VLDL s'associe aux autres apoprotéines et est maturée en VLDL par glycosylation, lipidation et phosphorylation avant d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire. PM : membrane plasmique ; TAG : triacylglycérol.

2.4 Intérêt socioéconomique des lipides

Les lipides ont une importance économique considérable, principalement dans le secteur agroalimentaire, ainsi que plus récemment dans le domaine de l'énergie

et de la chimie verte. La production, la transformation et l'utilisation des lipides sont au cœur d'enjeux sociétaux déterminants, particulièrement en temps de crise (cf. 2.4.2 ci-dessous). Enfin, l'industrie des lipides génère de considérables volumes d'échange. Par exemples, la production mondiale des huiles végétales représente environ 160 millions de tonnes par an [187] soit une valeur marchande d'environ 170 milliards de dollars (USD).

2.4.1 L'économie des lipides

Les huiles végétales

Les huiles végétales sont la principale source d'acides gras sous forme de triacylglycérols. Elles peuvent provenir de l'extraction de graines oléagineuses (tournesol, colza, coton) ou de fruits (olive, noix, arachides, coco). Près de 90% de la production mondiale d'huiles végétales proviennent de quatre huiles majeures (l'huile de palme, l'huile de soja, l'huile de colza et l'huile de tournesol) (Figure 2-27). La production, qui est soumise aux contraintes climatiques, est répartie en fonction de facteurs historiques et culturels. Ainsi, l'huile de palme, produite principalement en Malaisie et en Indonésie (85% de la production mondiale), représente plus du tiers de la production mondiale d'huile végétale (Figure 2-27). Inversement, l'Europe, pour des raisons culturelles, est la principale productrice et consommatrice d'huile d'olive (l'huile d'olive est un produit purement méditerranéen) avec 73% de la production mondiale. La cotation des huiles végétales suit l'évolution des prix des matières premières agricoles [188] ; après une forte hausse dans le début des années 2000, les cours sont aujourd'hui globalement à la baisse.

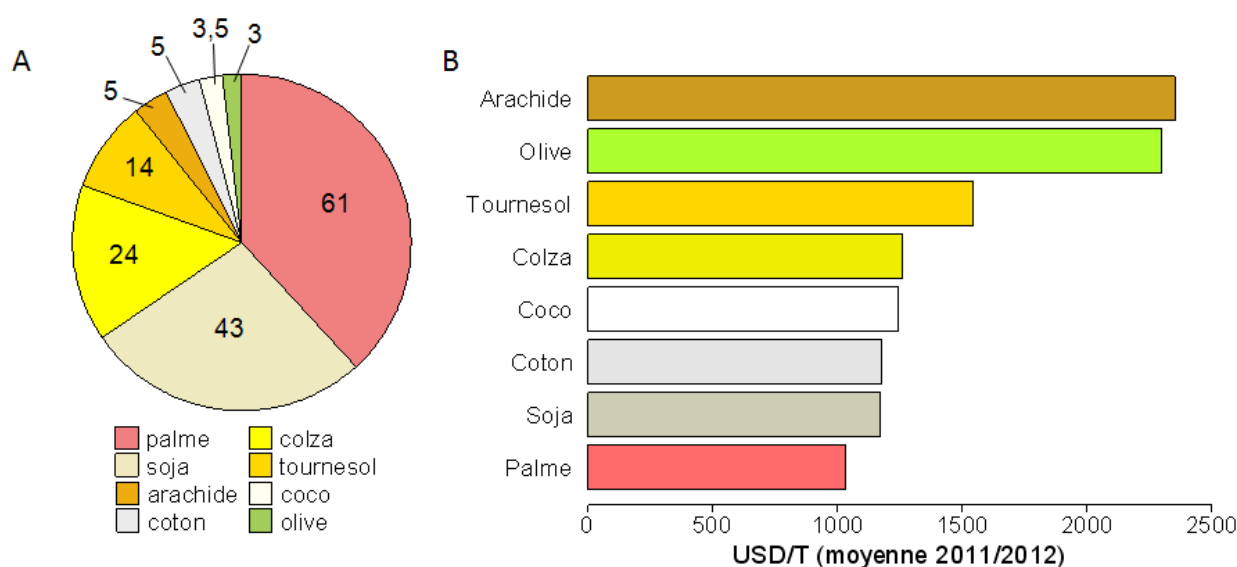


Figure 2-27 : Huiles végétales. (A) Part relative des principales huiles végétales comestibles. Les chiffres indiquent la production mondiale annuelle en 2012/2013 (en millions de tonnes) ; (B) Cotation moyenne des principales huiles végétales en 2011/2012 en dollars US par tonne (USD/T). [187]

Les huiles végétales, à l'exception de l'huile de palme, sont liquides à température ambiante en raison de leur composition riche en acides gras insaturés (acide oléique 18:1(n-9) et acide linoléique 18:2(n-6)) (Tableau 2-1). Grâce à sa richesse en acides gras saturés (acide palmitique 16:0), l'huile de palme est concrète (solide à température ambiante).

Tableau 2-7 : Composition moyenne de cinq huiles végétales majeures. (modifié d'après Gurr, Harwood, & Frayn, 2002)

		Palme	Soja	Colza	Tournesol	Olive
14:0	Acide myristique	1				
16:0	Acide palmitique	43	11	4	6	10
18:0	Acide stéarique	4	4	2	6	2
18:1(n-9)	Acide oléique	41	22	56	18	78
18:2(n-6)	Acide linoléique	10	53	26	69	7
18:3(n-3)	Acide α linolénique		8	10		1
20:1	Acide gondoïque		1	2		
22:1	Acide érucique					

Composition en % massique (i.e. g pour 100 g d'acide gras total)

La valorisation des tissus adipeux

Les graisses animales proviennent de la récupération et de la valorisation des tissus graisseux des animaux sous forme de suifs (graisse de bœuf), de saindoux (graisse de porc) de graisses animales et d'huiles de poissons. On distingue 3 catégories de sous-produits animaux (SIFCO, syndicat des industries françaises des coproduits animaux) :

1. Catégorie 1 (destinée à la destruction) : sous-produits provenant d'animaux d'origine suspecte (abattages sanitaires) ou non traçable (animaux de compagnie) ;
2. Catégorie 2 (interdite pour l'alimentation humaine ou animale) : sous-produits de l'équarrissage (animaux morts hors abattoirs) ;
3. Catégorie 3 (valorisable en alimentation) : sous-produits issus d'animaux sains obtenus en condition contrôlée

Les graisses des catégories 1 et 2 sont utilisées comme combustibles de chaudière. L'avantage, par rapport au fioul dont ils sont une alternative équivalente en terme de rendement énergétique, est que leur combustion ne dégagerait pas de soufre ni d'azote (Ministère de l'Agriculture). Plus de la moitié des graisses de catégories 3 sont traditionnellement destinées à la lipochimie, en particulier à la fabrication de savon (saponification) (53% de la production). Le tiers de la production de graisses animales est destiné à l'alimentation animale (Figure 2-28). Seules les graisses de volaille et de porc (saindoux) sont utilisées en alimentation humaine (à l'exception des graisses de bœuf (suifs) utilisées en Belgique !). Récemment, les graisses animales ont aussi été utilisées dans la fabrication de biocarburants.

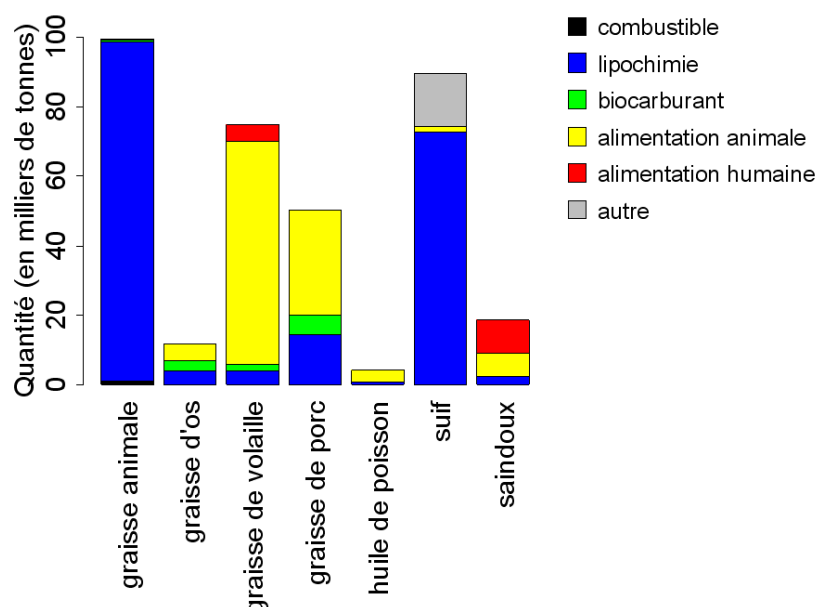


Figure 2-28 : Destination des corps gras animaux de catégorie 3 en 2012 (syndicat des industries française des coproduits animaux (SIFCO)). Les *graisses animales* sont un sous-produit issu de l'abattage des ruminants (bovins, ovins et caprins). La *graisse d'os* provient du dégraissage à la chaleur des os issus d'abattage. Les *graisses de porc* sont issues du dégraissage des os de porc et du traitement de la couenne. Le *suif* est la graisse de bœuf obtenue après abattage (et donc non utilisable en alimentation humaine). Enfin le *saindoux* provient du traitement du gras de porc avant abattage.

Les graisses des animaux terrestres sont solides à température ambiante en raison de leur richesse en acides gras saturés (acide palmitique et acides gras à courtes chaînes pour les graisses d'origine ovine ou caprine) (Tableau 2-8). Inversement, les huiles de poissons sont riches en acides gras mono-insaturés et polyinsaturés à longues chaînes. En particulier les poissons gras (saumon, sardine, maquereau, hareng) apportent des acides gras polyinsaturés essentiels de la famille des oméga-3 (EPA ou DHA par exemple).

Tableau 2-8 : Composition en acides gras de quelques graisses et huiles animales [189]

		Bœuf	Porc	Ovin Caprin	Volaille	Poisson (huile de foie de morue)
4:0-12:0	(acides gras à courtes chaînes)			10-20		
14:0	Acide myristique	3	1	11	1	6
16:0	Acide palmitique	26	25	26	27	8
16:1	Acide palmitoléique	9	3	3	9	10
18:0	Acide stéarique	8	13	11	7	3
18:1(n-9)	Acide oléique	45	45	26-29	45	17
18:2(n-6)	Acide linoléique	2	16	2		3
20:1	Acide gondoïque					25
22:1	Acide érucique					
20:5(n-3)	Acide eicosapentaénoïque (EPA)					10
22:6(n-3)	Acide docosahexaénoïque (DHA)					11

Composition en % massique (ie. g pour 100 g d'acide gras total)

Les matières grasses laitières

La production mondiale annuelle de lait est supérieure à 700 milliards de litres ce qui représente une valeur marchande de plus de 200 milliards d'euros. La production mondiale est en progression, soutenue par une augmentation de la demande asiatique [190]. En France, les matières grasses laitières (beurre principalement) représentent près de 20% de l'utilisation du lait (évaluée en matière sèche utile du lait).

Le beurre est une matière grasse tartinable (émulsion d'eau dans l'huile) à teneur en lipides d'origine laitière comprise entre 80% et 90% (Groupe d'Etude des Marchés de Restauration Collective et de Nutrition (GEMRCN)) [191]. La France est le plus gros consommateur de beurre avec plus de 7 kg consommés par an et par habitant (C.N.I.E.L.) (Figure 2-29). Ainsi, deux beurres bénéficient d'une appellation d'origine contrôlée (beurre d'Issigny et beurre Charente-Poitou). La fabrication du beurre repose sur l'agitation énergétique de la crème du lait pour séparer les lipides qui s'agrègent ensuite entre eux (le beurre) du liquide résiduel (le babeurre). Traditionnellement, la crème est battue dans une baratte (barattage) pour donner du "beurre de baratte".

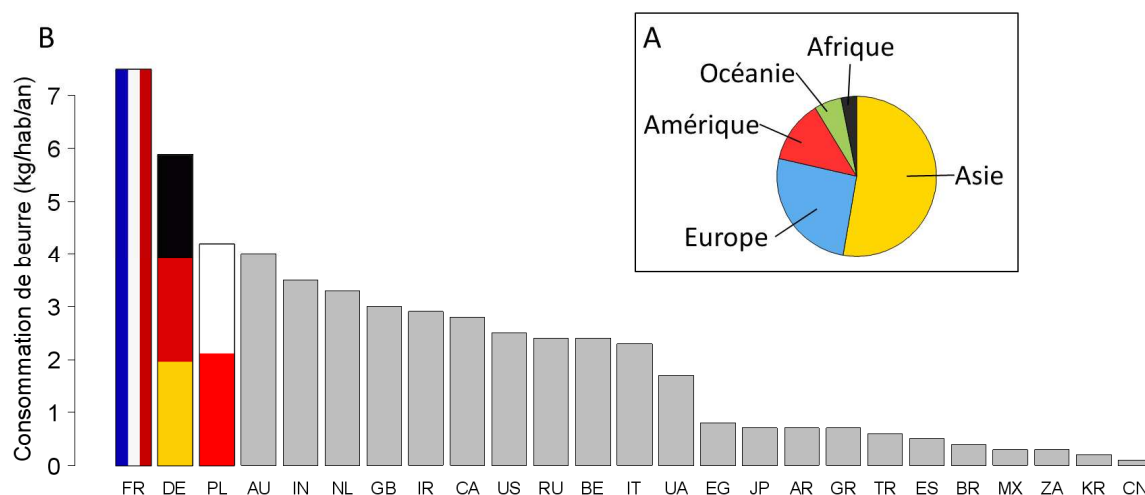


Figure 2-29 : Production et consommation mondiale de beurre. (A) Part relative de chaque continent dans la production mondiale de beurre ; (B) Consommation des 25 pays les plus consommateurs de beurre (en kg/habitant/an). (D'après les données du rapport 2013 du Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière (C.N.I.E.L) [190]).

L'utilisation des lipides

Les lipides sont une matière première indispensable pour l'industrie agroalimentaire car ils sont directement responsables de la texture et du goût des aliments. Les surfactants ou émulsifiants sont des lipides amphiphiles dont l'utilisation est très largement répandue pour améliorer ou modifier la palatabilité des aliments. Les surfactants ont de multiples rôles allant de la stabilisation d'une émulsion, l'aération des crèmes glacées, l'allongement de la conservation des produits panifiés, ou le contrôle de la texture (agent texturant).

Une autre utilisation historique des lipides est la saponification (hydrolyse basique des triacylglycérols) à la base de l'industrie des savons et des détergents.

Les lipides sont aussi utilisés dans les procédés d'encapsulation de certains produits pharmaceutiques ou cosmétiques. Les micelles ainsi formées permettent d'augmenter la biodisponibilité du principe actif.

La raréfaction des ressources pétrolières, non renouvelables, a engendré un regain d'intérêt pour l'utilisation des lipides comme source de carbone dans l'industrie chimique. L'oléochimie verte permet de produire les précurseurs des synthèses chimiques à partir des huiles végétales. Les huiles peuvent aussi être directement utilisées comme carburant (biodiesels) dans les moteurs diesels.

Enfin, les lipides sont aussi utilisés dans les peintures et les cires.

2.4.2 Les enjeux de la filière des lipides

L'huile de palme : exception culturelle française

L'huile de palme représente 30% à 35% de la production d'huile végétale mondiale et 85% de sa production est réalisée en Malaisie et en Indonésie [192]. L'oléiculture (culture du palmier à huile) est caractérisée par un rendement exceptionnel expliquant en partie le coût de production très faible de l'huile de palme, parmi les plus bas des huiles végétales (coût de production inférieur de 20% à celui du soja [193]). Ainsi, l'oléiculture peut générer des revenus stables et

élevés pour des populations rurales du Sud sur plusieurs générations. C'est pourquoi l'élaiculture s'est fortement développée dans la zone intertropicale ces dernières années, et est à l'origine de perturbations anthropiques majeures pour ces écosystèmes fragiles (déforestation, concurrence avec les forêts primaires sanctuaires de biodiversité, utilisation massive d'intrants). Ainsi certaines ONG écologistes pointent du doigt les ravages de la déforestation massive de la forêt tropicale sur les dernières populations d'Orang-outang (www.sauvonslaforet.org, WWF). C'est pour lutter contre les dérives d'une industrialisation massive de l'élaiculture, que des labels ont été mis en place comme par exemple celui de la table ronde pour une huile de palme durable (RSPO, *Roundtable on Sustainable Palm Oil* [194]).

Du point de vue nutritionnel, l'huile de palme est plus riche en acides gras saturés (AGS), en particulier l'acide palmitique (45% à 55%) (Tableau 2-7). Or un régime alimentaire riche en AGS augmente le risque de développer des pathologies cardiovasculaires [195]. L'huile de palme doit donc être consommée avec modération. Paradoxalement, la composition riche en AGS de l'huile de palme en fait une huile végétale intéressante pour l'industrie agroalimentaire : c'est une huile concrète (solide à température ambiante), bon marché, ayant une bonne résistance à l'oxydation et aux traitements thermiques [193]. Ainsi, on la retrouve dans de nombreux produits finis, sous la mention « huile(s) végétale(s) » dont les qualités organoleptiques et la palatabilité (fondant, onctuosité, croquant, croustillant, etc.) sont en majeure partie apportée par les matières grasses.

Les autorités sanitaires recommandent un apport varié et équilibré en matière grasse de façon à apporter les acides gras essentiels en quantité suffisante. Or, l'omniprésence de l'huile de palme dans l'industrie agroalimentaire va à l'encontre de ces recommandations. Ce problème est à l'origine de *l'amendement « Nutella »* proposé par le sénateur Yves Daudigny. Cette proposition avait comme objectif de diminuer l'utilisation de l'huile de palme par l'industrie agroalimentaire en augmentant les taxes liées à son importation. A terme, cela aurait favorisé l'utilisation de matières grasses alternatives pour diversifier l'apport de matières grasses pour l'alimentation humaine. Cette proposition a été vivement critiquée par les pays producteurs et n'a pas été suivie par les autres grands consommateurs d'huile de palme (Inde, Chine, Europe et Etats Unis principalement [192]). Cette proposition de loi à l'origine de la stigmatisation de l'huile de palme a finalement été abandonnée.

En conclusion, la charge exercée contre l'huile de palme vise la composition en acide gras saturés dont l'abus dans les régimes occidentaux est l'un des facteurs de l'épidémie d'obésité des pays du Nord (cf. 3.3.4 ci-dessous). L'huile de palme n'est pas mauvaise en soi pour la santé dans le sens où sa consommation raisonnée n'est pas toxique. Parallèlement, l'élaiculture raisonnée permet aux pays du Sud, situés en zone intertropicale, d'accéder à une source de revenus stables et élevés profitant à une population rurale défavorisée (50% de l'huile de palme est produite dans des exploitations familiales de petite taille). A l'interface entre développement économique des pays producteurs et retentissement d'un régime alimentaire trop riche, l'utilisation de l'huile de palme n'est contestée qu'en France.

Peut-on remplacer le pétrole par de l'huile ?

En France, environ 70% du parc automobile a un moteur diesel. Le *taux de diésélisation* français est parmi les plus forts d'Europe. Dans les autres pays, le ratio diesel/essence est plus équilibré (taux de diésélisation entre 30% et 50%). Cette diésélisation massive du parc automobile français est expliquée par des choix politiques. Dans les années 80, afin de relancer l'économie, la France met en place un allègement des taxes sur le diesel pour soutenir l'agriculture et l'industrie (taux de taxation des produits pétrolier – la TIPP, taxe intérieure de consommation sur les produits pétroliers ; remplacée depuis 2013 par la TICPE, taxe intérieure de consommation sur les produits énergétiques – plus faible et déduction de la TVA). Ce subventionnement du diesel a aussi permis de soutenir l'industrie automobile française, spécialisée dans la motorisation diesel. Cependant, le fort taux de diésélisation implique une grande consommation de diesel, non satisfaite par la seule production des raffineries françaises (la distillation fractionnée atmosphérique du pétrole brut ne permet de récupérer que 20% à 30% de gazole, dont deux tiers sont utilisés dans la production du diesel). Ainsi, une grande partie du diesel consommé doit être importée (Russie principalement [Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie]).

Les moteurs diesels rejettent dans l'atmosphère des particules, ayant pour origine la combustion incomplète du carburant. Les particules en suspension dans l'atmosphère sont classées selon leur taille. Les particules fines ont un diamètre inférieur à $2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$). L'OMS considère les particules fines contenues, entre autres, dans les gaz d'échappement, comme cancérigènes et directement responsables d'atteintes pulmonaires (comme l'asthme) et de maladies cardiovasculaires. L'OMS recommande une exposition au $\text{PM}_{2,5}$ inférieure à $25\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24h [196]. La pollution aux particules fines a principalement des causes anthropiques ; la combustion du bois étant la principale source de particules fines, suivie par la combustion des carburants dérivés du pétrole (fioul domestique, diesel, gaz, etc.).

Les moteurs diesels étaient initialement conçus pour fonctionner indifféremment avec de l'huile de pétrole ou avec de l'huile végétale. Le faible coût du pétrole avant les chocs pétrolier a favorisé l'utilisation du diesel. En réponse à l'augmentation du prix du pétrole ces dernières années et pour réduire les émissions de gaz à effet de serre (réchauffement climatique), le développement de carburants alternatifs est une solution de plus en plus envisagée. Les biocarburants permettraient de réduire de 60% à 90% les émissions de gaz à effet de serre par rapport à l'utilisation de ressources fossiles (ADEME¹) [197]. En effet, le rejet de gaz à effet de serre lors de la combustion des huiles végétales est en partie compensé par leur absorption par la plante lors de sa croissance (photosynthèse). De plus, les huiles végétales ont l'avantage de représenter une ressource renouvelable et leur combustion émettraient moins de particules fines.

L'utilisation d'huiles végétales brutes (non raffinées) pose des problèmes techniques pour une utilisation à grande échelle. L'huile végétale se fige en hiver à cause de sa température de fusion insuffisamment basse. De plus, la qualité

¹ Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie

inégale des huiles brutes (dépendant du type d'huile et du procédé d'extraction) nécessiterait d'adapter les moteurs pour chaque huile, ce qui n'est pas envisageable dans les moteurs diesels récents.

Le biodiesel est une huile végétale raffinée et standardisée, dont les qualités homogènes présentent des caractéristiques proche de celles du diesel. Le biodiesel peut être utilisé sans restriction dans les moteurs diesels récents. Cependant les capacités de production actuelles ne permettent pas encore une production en masse de biodiesel, la production étant d'environ 20 millions de tonnes par an (les besoin en diesel en Europe et aux États Unis sont de près de 500 millions de tonnes par an). Le biodiesel est issu de la transestérification des triacylglycérols avec un alcool (méthanol – EMVH (ester méthylique d'huiles végétales) ou éthanol – EEVH (ester éthylique d'huiles végétales)) (Figure 2-30). N'importe quelle huile végétale peut être utilisée pour produire des biodiesels (huile alimentaire, huile non alimentaire, huile de friture, etc.).

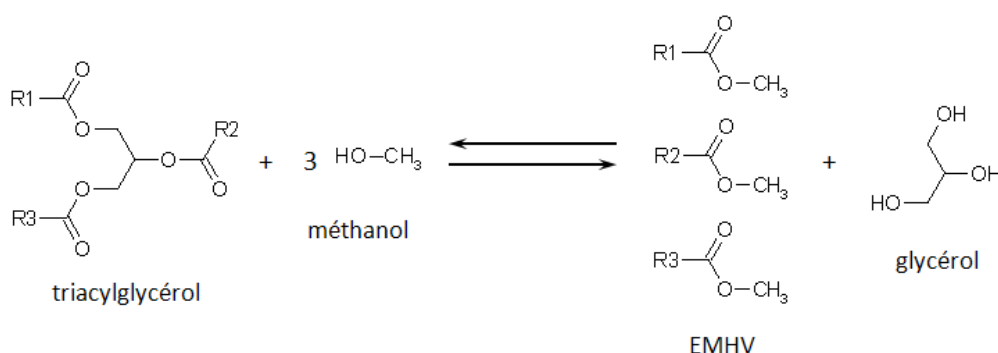


Figure 2-30 : Production de biodiesel par transestérification. La production de biodiesel repose sur la transestérification des triacylglycérols contenu dans les huiles végétales avec un alcool (méthanol, éthanol, etc) et coproduit du glycérol, valorisable (glycérine). EMHV : ester méthylique d'huiles végétales (biodiesel).

Les biodiesels de *première génération* utilisent des huiles alimentaires (colza en France) ce qui pose la question de la compétition avec l'alimentation humaine. Pour cela, les biocarburants de *deuxième génération* utilisent des ressources végétales non alimentaires (huiles non alimentaire comme par exemple l'huile de jatropha extraite des graines de *Jatropha curcas*). La valorisation des coproduits (déchets) de l'industrie agroalimentaire ou papetière pourrait être une solution. Enfin, les biocarburants de *troisième génération* utilisent les huiles produites par certaines espèces de micro-algues (comme par exemple *Chlamydomonas reinhardtii* ou *Botryococcus braunii*). La production de micro-algues en photo-bioréacteurs présente de nombreux avantages potentiels mais des défis technologiques et scientifiques reste à surmonter pour démontrer sa faisabilité industrielle [198]. Les biodiesels de deuxième et de troisième génération nécessitent donc encore des efforts de recherche ; en particulier en terme de rendement lipidique des espèces utilisées [199–201].

Outre l'utilisation en carburant, le pétrole est aussi utilisé par l'industrie pétrochimique pour la synthèse de molécules chimiques. Les huiles végétales représentent, pour ce secteur une source de carbone alternative [200] séduisante – propre (dans la limite d'une agriculture raisonnée), écologiques (bilan carbone faible ou nul) et potentiellement économique sur le long terme. Cette utilisation des huiles végétales n'en est pour le moment qu'au stade expérimental.

3 Lipides et Trafic intracellulaire

3.1 Les lipides, acteurs du trafic intracellulaire

3.1.1 Composition différenciée des membranes internes

Les membranes de la cellule ne sont pas homogènes en composition lipidique (sans parler de la composition protéique). Il existe un gradient de teneur en sphingolipides et en cholestérol du réticulum, qui n'en comporte quasiment pas, à la membrane plasmique, où leurs concentrations sont maximales [202–204]. Or les sphingolipides possèdent majoritairement des chaînes d'acides gras saturées. Les membranes enrichies en sphingolipides et cholestérol sont *in vitro* préférentiellement dans une phase l_o (*liquid ordered*), où les lipides sont plus densément agencés et plus rigides. Ainsi, il est possible de distinguer deux territoires membranaires au sein de la cellule (Figure 3-1) :

- les membranes de la voie sécrétoire précoce, avec de nombreux défauts de *packing*, fluides,
- la membrane plasmique et les endosomes, plus rigides.

Le Golgi possède une composition intermédiaire, et présenterait un gradient en cholestérol et sphingolipides du *cis*-Golgi au *trans*-Golgi, faisant le lien entre les deux territoires membranaires.

L'enrichissement relatif des membranes endosomales en sphingolipides et cholestérol est assuré en partie par un tri lipido-protéique réalisé au niveau du Golgi. Les protéines transmembranaires des endosomes possèdent des domaines transmembranaires plus longs que ceux des protéines du Golgi ou du réticulum endoplasmique [205]. Ces protéines vont donc se retrouver dans des microdomaines enrichis en sphingolipides et cholestérol. Deux hypothèses peuvent expliquer le tri des protéines et des lipides [202], [205] :

1. Les lipides se *démixent* et forment des microdomaines, possédant une affinité pour les protéines endosomales ;
2. Le regroupement des protéines à exporter (recrutement d'un manteau par exemple) entraîne la formation d'un microdomaine lipidique en raison de l'épaisseur des domaines transmembranaires.

Outre les sphingolipides et le cholestérol, les phosphoinositides (dérivés phosphatés du phosphatidylinositol) montrent aussi une répartition non aléatoire dans les membranes internes (cf. 3.1.2 ci-dessous).

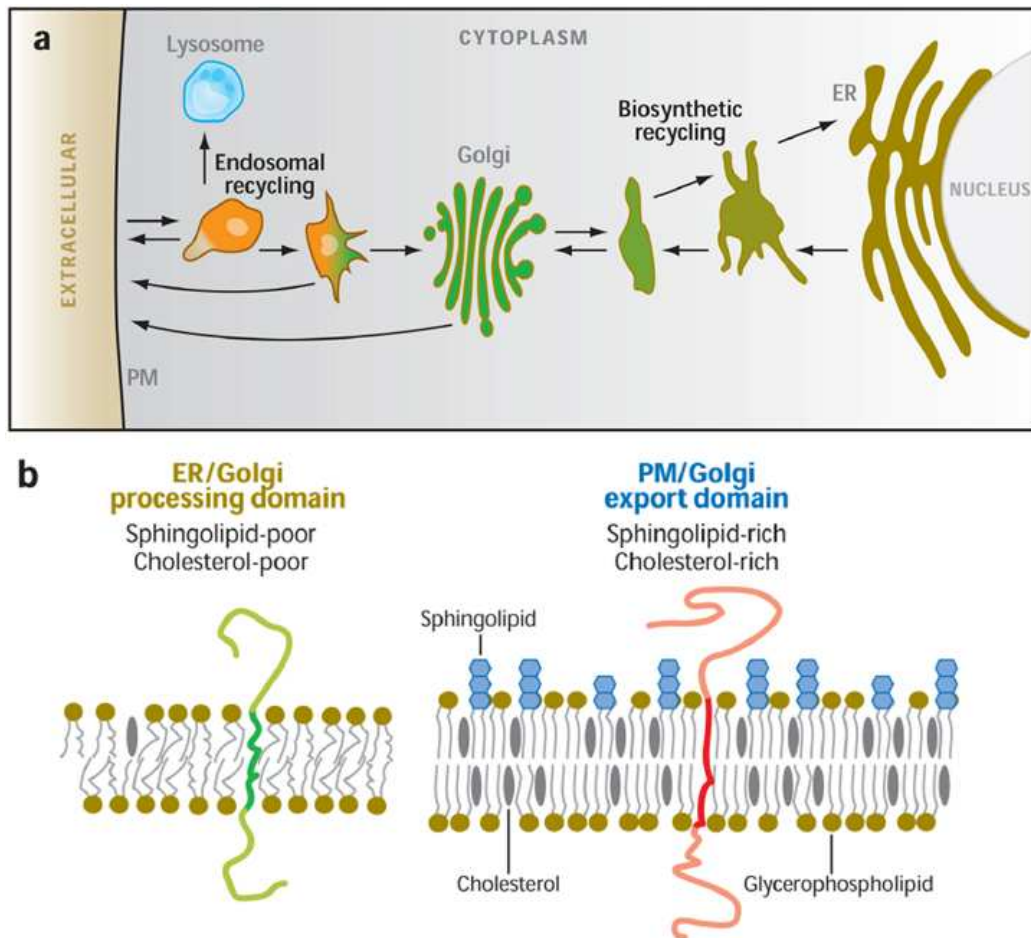


Figure 3-1 : Représentation du gradient lipidique et de son rôle dans le tri des protéines [202]. (a) Les membranes de la voie sécrétoire précoce (*Biosynthetic recycling*) sont pauvres en sphingolipides et cholestérol. Inversement, les membranes du système endosomal sont enrichies en sphingolipides et cholestérol ; (b) Les membranes de la voie sécrétoire précoce sont plus fines, moins denses et plus fluides alors que les membranes endosomales qui sont plus rigides et plus épaisses, permettent d'accueillir des protéines ayant un domaine transmembranaire plus long.

Le maintien de la composition des membranes est cruciale pour la cellule. L'un des explications de la distribution intracellulaire des lipides repose en partie sur leur voie de biosynthèse. Les précurseurs de phospholipides sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique puis sont transférés dans un autre compartiment (dans des vésicules de transport ?) où ils seront modifiés (Figure 3-2). Ainsi, les glycéroglycérophospholipides (phospholipides glycosylés) sont formés dans le Golgi où résident les glycosyltransférases réalisant l'ajout des oses.

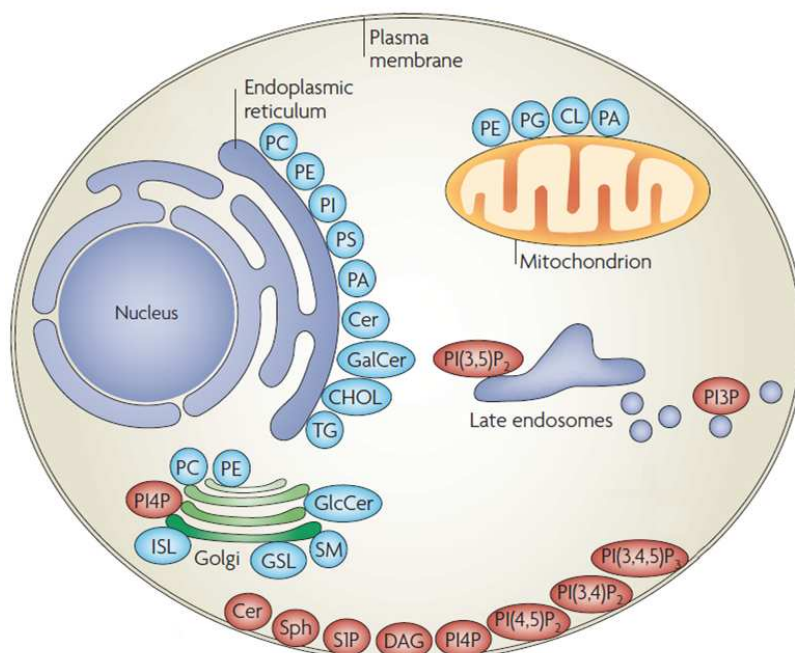


Figure 3-2 : Synthèse et localisation à l'équilibre des phospholipides cellulaires (modifié d'après [113]). Le schéma indique le site de synthèse des lipides (en bleu) et la localisation des lipides impliqués dans la reconnaissance des membranes (en rouge). Cer : céramide ; GalCer : galactosylcéramide ; CHOL : cholestérol ; GlcCer : glucosylcéramide ; SM : sphingomyéline ; GSL : glycosphingolipides ; ISL : inositol sphingolipides ; Sph : sphingosine ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; CL : cardiolipin.

Enfin, les deux feuillets de la membrane plasmique ne sont pas symétriques. Le feuillet intracellulaire est enrichi en phosphatidylsérine (PS), phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphoinositides alors que le feuillet extracellulaire contient majoritairement des sphingolipides, des phosphatidylcholines et des glycolipides (Figure 3-3) [206], [207]. Cette asymétrie est maintenue par des *flip-floppases* qui catalysent le passage d'un feuillet à un autre des lipides. Un transporteur dépendant de l'hydrolyse de l'ATP de la famille des transporteurs ABC (ABCC1) est impliqué dans le transport de la phosphatidylcholine vers le feuillet extracellulaire (*flop*) [208]. Le transport *flip* (du feuillet extracellulaire vers le feuillet cytosolique) du PS et du PE est assuré par une ATPase de P-type IV (P4-ATPase) [209]. Enfin, des *scramblases* (littéralement *mélangeases*) assurent le transport bidirectionnel des phospholipides selon leur gradient. Les *scramblases* vont donc avoir tendance à rompre l'asymétrie de la membrane. Dans les cellules apoptotiques, la diminution de la production d'ATP lié à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie entraîne un arrêt du fonctionnement des *flip-floppases* membranaires et donc l'exposition de phosphatidylsérine sur le feuillet extracellulaire de la membrane plasmique.

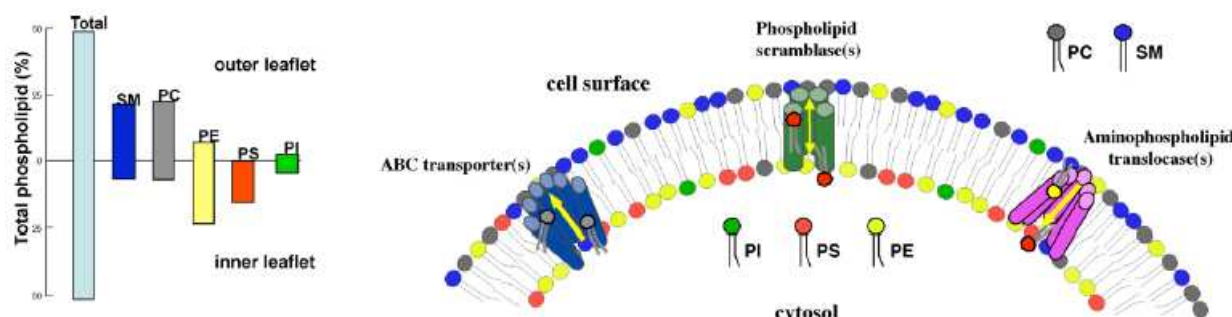


Figure 3-3 : La membrane plasmique est asymétrique [207]. Le feuillet cytosolique est enrichi en phospholipides chargés négativement alors que le feuillet extracellulaire est enrichi en glycolipides et sphingolipides. Cette asymétrie est activement maintenue par des *flippases* (transporteurs ABC et translocases).

3.1.2 Rôles des phosphoinositides dans le trafic vésiculaire

Les phosphoinositides, marqueurs de membranes

Les phosphoinositides (PtIns) sont des dérivés réversiblement phosphorylés en position 3, 4 ou 5 du groupement inositol du phosphatidylinositol. Il existe ainsi sept phosphoinositides (Figure 3-4) :

- trois phosphoinositides monophosphates (PtIns3P, PtIns4P et PtIns5P),
- trois phosphoinositides biphosphates (PtIns(3,4)P₂, PtIns(3,5)P₂ et PtIns(4,5)P₂),
- un phosphoinositide triphosphate (PtIns(3,4,5)P₃).

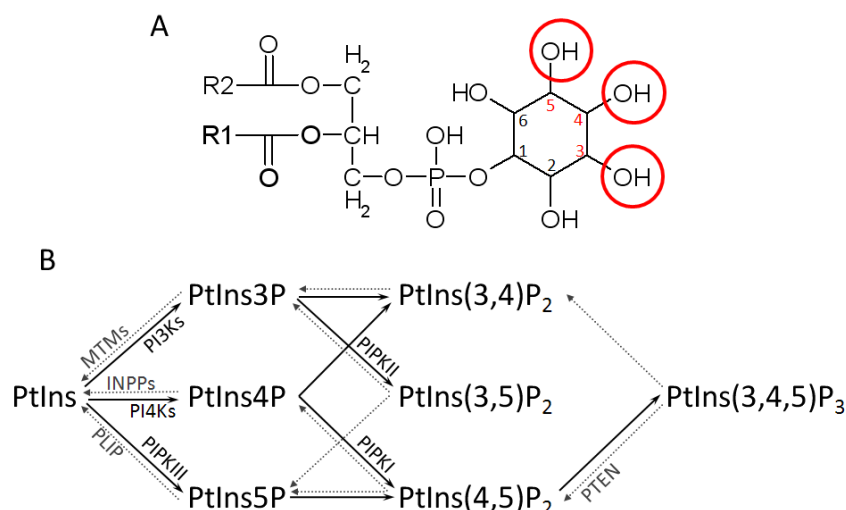


Figure 3-4 : Métabolisme des phosphoinositides (modifié d'après [210], [211]). (A) Structure du phosphatidylinositol montrant la position des carbones 3, 4 et 5 pouvant être phosphorylés (entourés en rouge) ; (B) Schéma de conversion des phosphoinositides à partir du PtIns. MTM, myotubularines ; INPPs, inositol polyphosphate phosphatases ; PTEN, *phosphatase and tensin homologue* ; PLIP, *PTEN-like lipid phosphatase* ; PI3Ks, PtIns3 kinases (classes I, II ou III) ; PI4Ks, PtIns4 kinases (type II ou III) ; PIPK, phosphatidylinositol phosphate kinase (classes I, I ou III).

Le phosphatidylinositol est le précurseur de base de tous les phosphoinositides. Les conversions sont assurées par des kinases et des phosphatases (Figure 3-4) [210], [212]. Les phosphoinositides sont une composante mineure des membranes (moins de 10% des phospholipides) [213] mais revêtent

une importance capitale dans de nombreux processus cellulaires, en particulier dans le trafic vésiculaire [212]. Ils se retrouvent dans les différentes membranes de la voie sécrétoire à l'exception de la membrane du réticulum endoplasmique. Ils sont insérés dans le feuillet interne des membranes, le groupement inositol exposé au cytosol et accessible aux kinases et phosphatases. De plus les phosphoinositides sont reconnus par une large variété de protéines cytosoliques grâce à des domaines d'interaction avec les phosphoinositides (PIBM, *PI-binding modules* [213]). Chaque domaine PIBM montre *in vitro* une préférence pour un ou plusieurs phosphoinositides. Les PIBM sont conservés et leur structure est connue (Figure 3-5) :

- le domaine FYVE fixe le PtIns3P ,
- le domaine PX (*PHOX homology*) fixe le PtIns3P ,
- le domaine PH (*pleckstrin homology*) fixe le PtIns(3,4,5)P_3 et le PtIns(4,5)P_2 ,
- les domaines ANTH et ENTH fixent le PtIns(4,5)P_2 et le PtIns4P

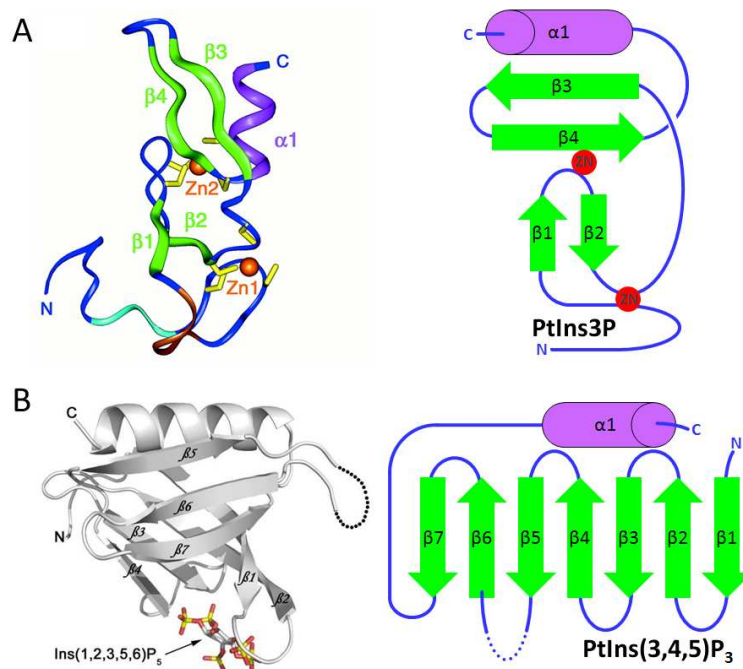


Figure 3-5 : Structure des domaines FYVE (A) et PH (B). (A) Structure du domaine FYVE de la protéine EEA1 [214] et représentation schématique du site de fixation du PtIns3P ; (B) structure du domaine C-terminal de la pleckstrine humaine (domaine PH) complexé avec le D-myo-inositol 1,2,3,5,6-pentakisphosphate (Ins(1,2,3,5,6)P_5) [215] et représentation schématique du site de fixation de PtIns(3,4,5)P_3 .

L'étude de la distribution cellulaire des phosphoinositides (grâce à l'expression de domaine spécifique de liaison aux phosphoinositides, et à la localisation et l'étude fonctionnelle des kinases et phosphatases) a permis de montrer que les compartiments de la voie endocytaire et du TGN portent un phosphoinositide particulier. Le PtIns3P est localisé sur les membranes des endosomes précoces et tardifs [216] ainsi que dans la membrane des phagosomes [217]. Le PtIns4P est spécifique des sites de sortie du TGN (*TGN exit sites*) [218]. Le PtIns(3,5)P_2 se retrouve concentré dans les endosomes tardifs et les corps multivésiculaires (MVB) alors que le PtIns(4,5)P_2 est majoritairement associé à la membrane plasmique (Figure 3-6).

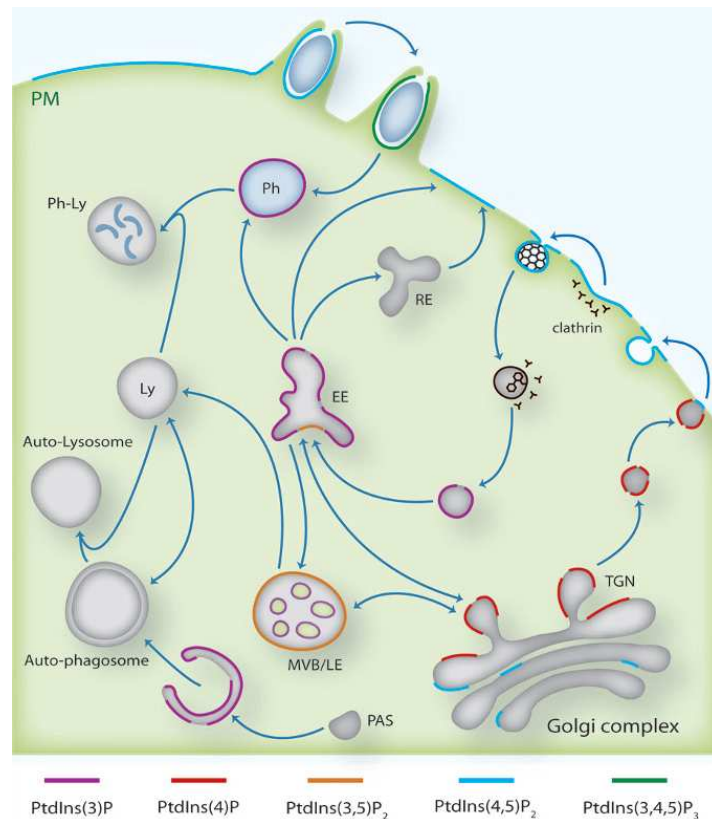


Figure 3-6 Distribution intracellulaire des phosphoinositides [219]. TGN, *trans*-Golgi network ; Ph, phagosome ; Ph-Ly, phago-lysosome ; Ly, lysosome ; RE, *recycling endosome* ; LE, *late endosome* ; PAS, pre-autophagosomal structure ; MVB, *multivesicular body* ; EE, *early endosome* ; PM, *plasma membrane*.

3.2 Les gouttelettes lipidiques, une organelle à part entière

Dans les cellules, dont les adipocytes, les triacylglycérols sont stockés dans des gouttelettes lipidiques. Elles sont connues depuis longtemps comme étant des inclusions de corps gras dans le cytoplasme des adipocytes. Si les adipocytes sont capables de synthétiser des gouttelettes lipidiques de grande taille (10 μm à 100 μm de diamètre), toutes les cellules eucaryotes auraient la capacité de synthétiser des petites gouttelettes lipidiques (de 100 nm à 1 μm de diamètre) [220]. Elles ont longtemps été décrites comme des organelles inertes de stockage de l'excès d'acides gras (et donc d'énergie) dans la cellule. Ces dernières années, les gouttelettes lipidiques ont acquis un statut d'organelles actives participant à de nombreux processus cellulaires et sont, de fait, devenues sujet d'étude (Figure 3-7).

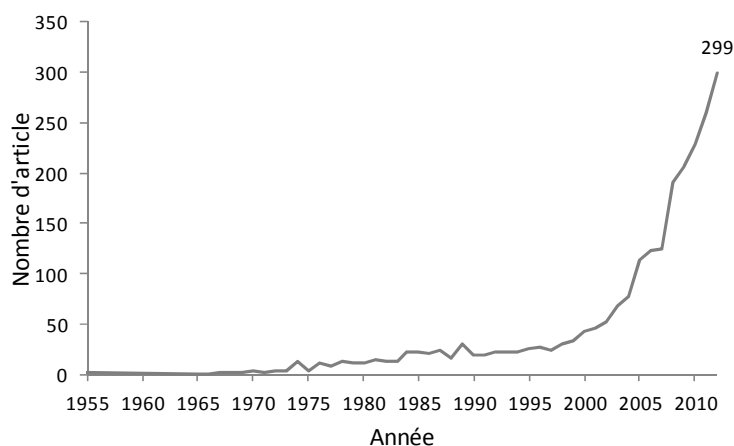
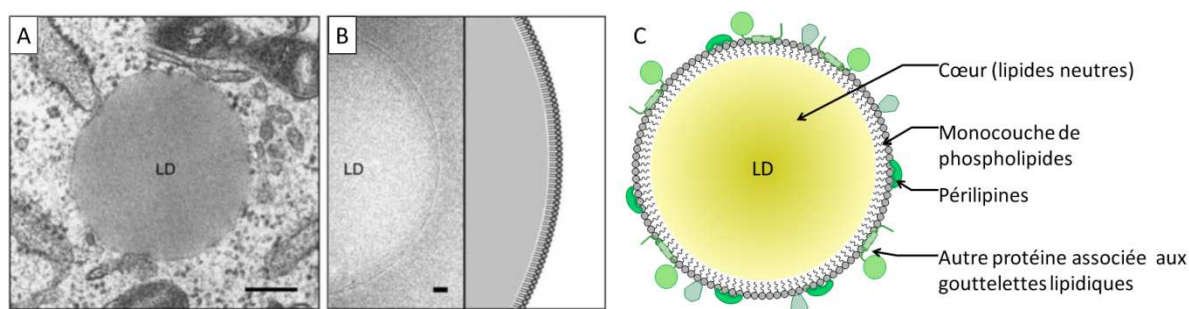


Figure 3-7 : Récurrence du terme *lipid droplet* dans la littérature scientifique (NCBI)

3.2.1 Une structure particulière

Une structure d'accumulation des lipides

Les gouttelettes lipidiques sont constituées d'un cœur de lipides neutres (ester de cholestérol et d'acides gras et triacylglycérols) [221] entouré d'une monocouche de phospholipides à laquelle sont associées des périlipines (PLIN1-5) [222–225] (Figure 3-8). La composition en acide gras des gouttelettes lipidiques peut évoluer en fonction de l'état physiologique de la cellule et reflète la composition en acide gras du milieu extracellulaire. Ainsi, lors de la différenciation des adipocytes, les triacylglycérols et les phospholipides sont enrichis en acide gras insaturés. Ainsi, la monocouche des gouttelettes lipidiques matures est plus fluide que la monocouche de gouttelettes lipidiques précoces [226].



Dans les cellules de mammifère, les phospholipides majoritaires de la monocouche sont des phospholipides neutres : le phosphatidylcholine (PC, 60%), le phosphatidyléthanolamine (PE, 24%) et le phosphatidylinositol (PI, 8%) [228]. En revanche aucun phosphoinositide n'a été identifié sur les gouttelettes lipidiques.

La synthèse du PC est assurée par la voie de Kennedy (ajout de choline sur un DAG) ou par méthylation du PE par une PE-méthyl transférase (PEMT). Ces deux voies de synthèse du PC sont réalisées sur le réticulum endoplasmique. Des études récentes montrent que la CTP:Phosphocholine cytidyltransférase (CCT) qui catalyse l'étape limitante de la synthèse du PC, est localisée sur les gouttelettes lipidiques, *via* une hélice amphipatique capable de détecter une baisse de la proportion de PC dans une bicouche [229]. Cependant, la dernière étape permettant le transfert du groupement choline sur un DAG est réalisée dans le réticulum. De même, les enzymes permettant la synthèse du PC à partir du PS et du PE se trouvent sur les mitochondries (PS décarboxylase pour former du PE) et le réticulum endoplasmique (PEMT) [228]. Ainsi, lors de la croissance des gouttelettes lipidiques, un transport du PC doit être effectué entre le réticulum et la monocouche des gouttelettes lipidiques. Un transport vésiculaire n'a pas été démontré, aussi l'une des hypothèses possibles est un transfert de lipides par des protéines de transport. Par exemple, certains membres de la famille des STARD sont capables de transférer le PC entre deux organelles [228], [230]. Cependant aucune protéine de transport du PC n'a été localisée autour des gouttelettes lipidiques pour l'instant. Néanmoins, ces protéines peuvent être concentrées dans les sites de contact entre le réticulum et les gouttelettes lipidiques pour permettre un transfert direct et rapide des lipides. Enfin, une continuité membranaire entre les gouttelettes et le réticulum peut permettre la diffusion des lipides [231].

Le cœur de lipide neutre ne formerait pas une phase uniforme. Les différents TAG peuvent se regrouper selon la température de fusion. Dans certaines conditions de croissance, les TAG et les esters de cholestérols peuvent être ségrégés [232], [233]. Les modélisations moléculaires des gouttelettes lipidiques montrent une structuration en feuillets.

Des protéines associées

En raison de leur composition, les gouttelettes lipidiques peuvent être assez simplement isolées par fractionnement sur gradient de sucrose [234]. Ainsi

plusieurs auteurs ont tenté d'établir l'analyse du protéome complet des gouttelettes lipidiques dans différents types cellulaires et différentes conditions [235–237]. Ces études permettent de mettre en évidence de nombreuses protéines associées aux gouttelettes lipidiques dans des systèmes aussi divers que *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila*, et différentes cellules de mammifères (lignée cellulaire ou tissu) [238]. Parmi les protéines le plus souvent identifiées, se trouvent les protéines à domaine PAT [239] ou périlipines [225] (PLIN1-5). Les périlipines partagent une même organisation (Figure 3-9) et sont localisées autour des gouttelettes lipidiques. Les périlipines ont un effet surfactant en s'associant à la monocouche des gouttelettes lipidiques *via* le domaine PAT. Les PLIN contrôlent la lipogenèse (croissance des gouttelettes lipidiques) et la lipolyse (mobilisation des lipides neutres) par des interactions de leur domaines C-terminaux avec d'autres partenaires qu'elles recrutent à la surface des gouttelettes lipidiques [240], [241].

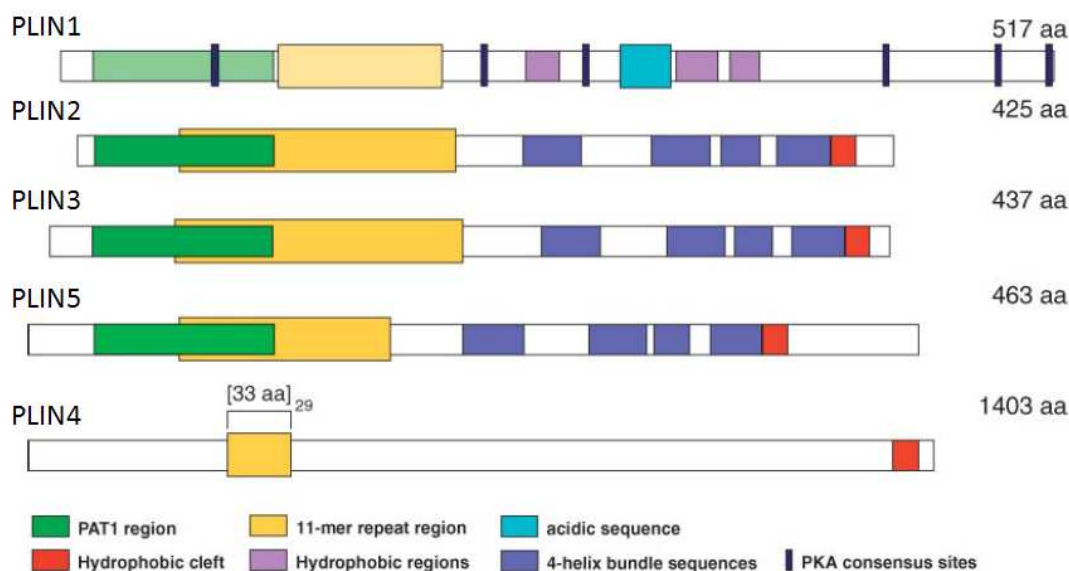


Figure 3-9 : Organisation structurale des périlipines (modifié d'après [241]).

PLIN1 est exprimée lors de la différenciation des adipocytes et régule la lipolyse [242], [243]. PLIN2 (ADRP), initialement découverte dans les cellules adipeuses, semble être ubiquitairement exprimée [244]. PLIN2 est associée à la membrane des gouttelettes lipidiques et induit le stockage des lipides neutres [245], [246]. PLIN-3 (TIP-47) est associée aux gouttelettes lipidiques mais possède aussi une localisation cytosolique [239], [247]. PLIN3 possède une structure similaire aux apoprotéines [248], et serait un transporteur d'acide gras permettant de réguler la croissance des gouttelettes lipidiques [249], [250]. De même PLIN4 (S3-12) régule la croissance des gouttelettes lipidiques en étant rapidement relocalisée sur les petites gouttelettes lipidiques lors du traitement par l'acide oléique de cellules en culture [251], [252]. Enfin, PLIN5 (OXPAT) régule la lipolyse en inhibant la lipase ATGL [253]. PLIN5 serait régulée par phosphorylation.

3.2.2 Une organelle aux rôles multiples

Les gouttelettes lipidiques sont les organelles de stockage de l'énergie sous forme de triacylglycérols, molécules hautement réduites dont le catabolisme oxydatif permet de générer de grandes quantités d'ATP (cf. 2.3.2 ci-dessus). Chez les vertébrés, cette fonction est dévolue aux adipocytes dont le cytoplasme est entièrement occupé par les gouttelettes lipidiques. A titre d'exemple, chez un individu non-obèse, les adipocytes stockent plus de 500 000 kJ sous forme de triacylglycérol dans les gouttelettes lipidiques (soit suffisamment d'énergie pour courir 30 marathons !) [254] La mobilisation de l'énergie des gouttelettes lipidiques est contrôlée par des signaux hormonaux et des cascades de signalisation [220].

Les gouttelettes lipidiques sont aussi le site de synthèse et du métabolisme des lipides. Dans les cellules stéroïdogènes des glandes surrénales et des gonades, les esters de cholestérols contenus dans les gouttelettes lipidiques sont mobilisés pour la production des hormones stéroïdiennes (stéroïdogénèse) [255]. Dans la plupart des cellules, les lipides utilisés pour les synthèses lipidiques (synthèse d'hormones, synthèse des phospholipides, etc.) proviennent préférentiellement des gouttelettes lipidiques [256]. L'estérification et la compartimentalisation des acides gras permettent aussi d'en diminuer les effets proapoptotiques et proinflammatoires. Les acides gras libres sont de puissants détergents et sont donc toxiques pour la cellule à haute concentration. Leur estérification permet de prévenir la lipotoxicité [257], [258].

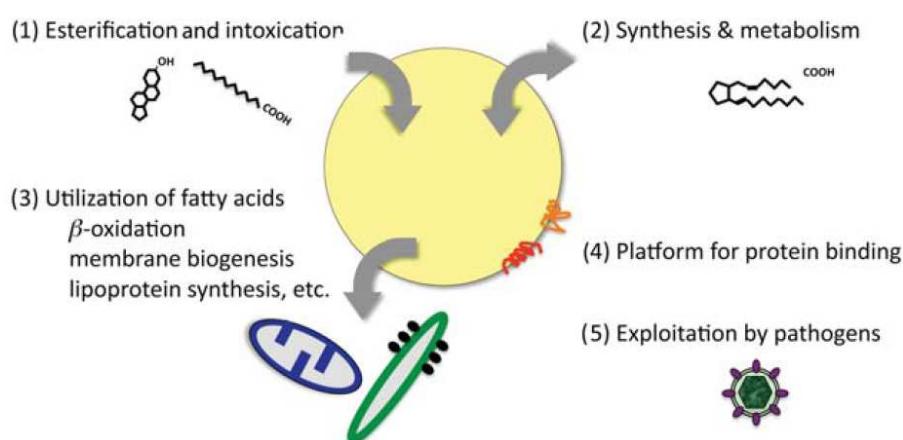


Figure 3-10 : Les gouttelettes lipidiques sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires [256]. (1) La compartimentalisation des acides gras libres et du cholestérol en excès assure une protection de la cellule contre la lipotoxicité ; (2) les gouttelettes lipidiques sont impliquées dans le métabolisme et la synthèse des lipides ; (3) les gouttelettes lipidiques représentent un réservoir d'acides gras mobilisables ; (4) la surface des gouttelettes lipidiques permet la ségrégation de protéines hydrophobes avant leur dégradation ; (5) les gouttelettes lipidiques sont détournées par certains pathogènes et sont la cible de certains médicaments.

Des données récentes montrent que la voie de dégradation par le protéasome [259] et la voie des autophagosomes interagissent avec les gouttelettes lipidiques [260], [261]. Ainsi, l'apoprotéine B est séquestré sur la surface des gouttelettes lipidiques avant sa dégradation [262]. Les gouttelettes lipidiques seraient une surface de stockage des protéines hydrophobes avant leur dégradation, permettant d'éviter la formation d'agrégats dans la cellule.

3.2.3 Dynamique spatio-temporelle des gouttelettes lipidiques

Le cœur de lipide neutre est composé majoritairement de triacylglycérols, dont la synthèse est assurée par une diacylglycérol-acyl-transférase (DGAT), et d'ester de cholestérol et d'acide gras dont la synthèse est assurée par une acyl-CoA:cholesterol acyl-transférase (ACAT). Ces deux enzymes sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique. Ainsi, le modèle de formation des gouttelettes lipidiques le plus actuel et le plus accepté repose sur l'accumulation de lipides neutres entre les deux feuillettes de la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 3-11) [221], [231], [263] sous forme de lentilles lipidiques. Ces lentilles bourgeonnent puis sont libérées dans le cytoplasme. Les gouttelettes lipidiques de petite taille ainsi générées (10 nm à 50 nm de diamètre) vont ensuite croître par fusion. Les gouttelettes pourraient aussi rester reliées au réticulum endoplasmique par un pont membranaire permettant la diffusion des lipides neutres jusque dans le cœur des gouttelettes lipidiques (Figure 3-12) [231].

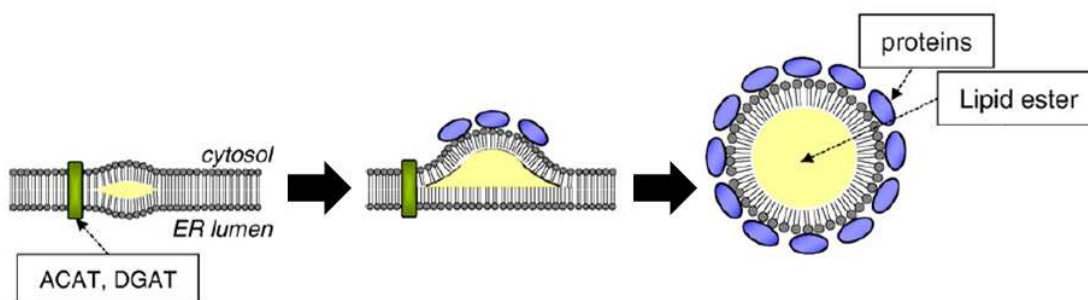


Figure 3-11 : Modèle consensus de la formation *de novo* des gouttelettes lipidiques [221]. L'acyl-CoA:cholesterol acyl-transférase (ACAT) et la diacylglycérol-acyl-transférase (DGAT) localisées dans le réticulum endoplasmique synthétisent les esters de lipides qui sont accumulés entre les deux feuillettes de la membrane pour former une *lentille*. L'accumulation des lipides induit un bourgeonnement du feuillet cytoplasmique et un recrutement de protéines spécifiquement associées aux gouttelettes lipidiques (périlipines à domaine PAT par exemple). Finalement, la gouttelette lipidique se sépare de la membrane du réticulum endoplasmique pour former des gouttelettes de petite taille

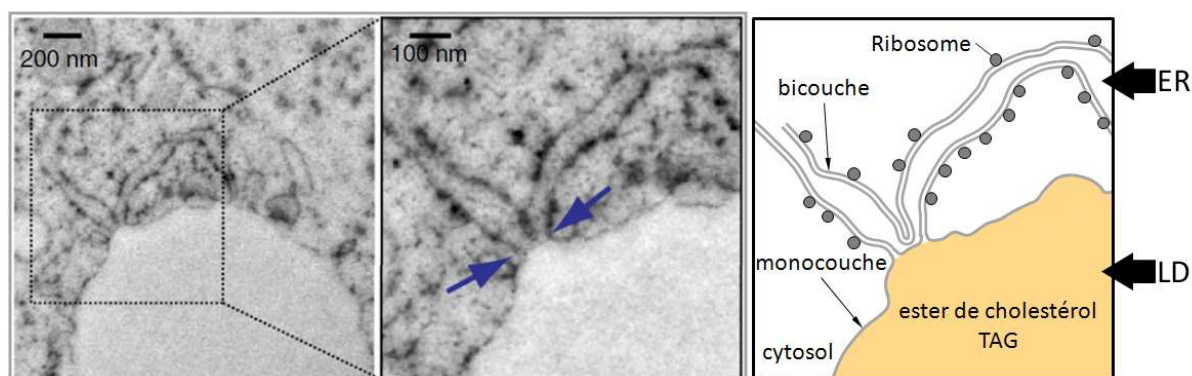


Figure 3-12 : Images de microscopie électronique de coupes ultrafines (60 nm) de cellules traitées à l'acide oléique et cryopréservées [231]. Les flèches bleues indiquent la continuité des membranes entre le réticulum endoplasmique (ER) et la gouttelette lipidique (LD). À droite, schéma d'interprétation. TAG : triacylglycérols.

Afin de mieux comprendre l'intégration des gouttelettes lipidiques dans la cellule, les études de protéomiques ont été menées sur des gouttelettes lipidiques

isolées de cellules de drosophile [237] ou de cellules de mammifère (entérocytes de souris [264]). Les protéines associées aux gouttelettes peuvent être regroupées dans trois catégories :

- les protéines et enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (Choline-phosphate cytidyltransferase A (CCT) [229], périlipines (PLIN), apolipoprotéines, etc.),
- les protéines impliquées dans le trafic intracellulaire (Rab18 [265], [266], Rab1, Rab7, SNARE, etc.),
- des protéines et enzymes membranaires localisées *a priori* sur d'autres compartiments, suggérant une association forte des gouttelettes lipidiques avec les autres organelles (réticulum endoplasmique et mitochondries principalement).

Ces données montrent que les gouttelettes lipidiques sont des organelles intégrées dans le trafic vésiculaire. En particulier, notre équipe a montré que le système GBF1-Arf1-COPI contrôlant le trafic rétrograde entre le réticulum et l'appareil de Golgi était important pour la localisation de PLIN2 et d'ATGL aux gouttelettes lipidiques [46], [51].

3.2.4 Particularité des corps lipidiques de la cellule végétale

Les cellules végétales sont, elles aussi, capables d'accumuler et de stocker des lipides dans des corps lipidiques composés, comme les gouttelettes lipidiques des cellules animales, d'un cœur de lipides neutres ceinturé d'une monocouche de phospholipides. Les protéines associées appartiennent à la famille des oléosines [267]. Dans les graines oléagineuses, les corps lipidiques sont concentrés dans l'embryon (Figure 2-16) et les oléosines sont la principale protéine exprimée.

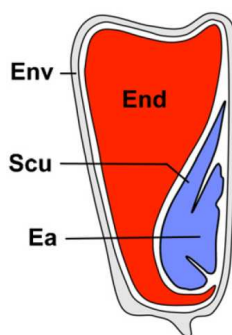


Figure 3-13 : Structure d'une graine de maïs (*Zea mays*). L'endosperme (End) est majoritairement composé d'amidon (rouge). Inversement, l'embryon (bleu) est enrichi en corps lipidiques. Env : enveloppe, Scu : *scutellum*, Ea : axe embryonnaire. [201]

Les oléosines forment une famille particulière sans homologie dans les cellules animales. Leur structure particulière est encore controversée. Les oléosines sont constituées de trois domaines (Figure 3-14) [267], [268] :

- un domaine N-terminal acylé formant une hélice amphipatique,
- un domaine central conservé de 70 à 80 acides aminés hydrophobes,
- un domaine C-terminal amphipatique, de structure variable.

Le domaine central est profondément inséré dans le corps lipidique où il se structurerait en deux brins bêta antiparallèles, reliés par une structure rigide de proline (*proline knot*) (Figure 3-14).

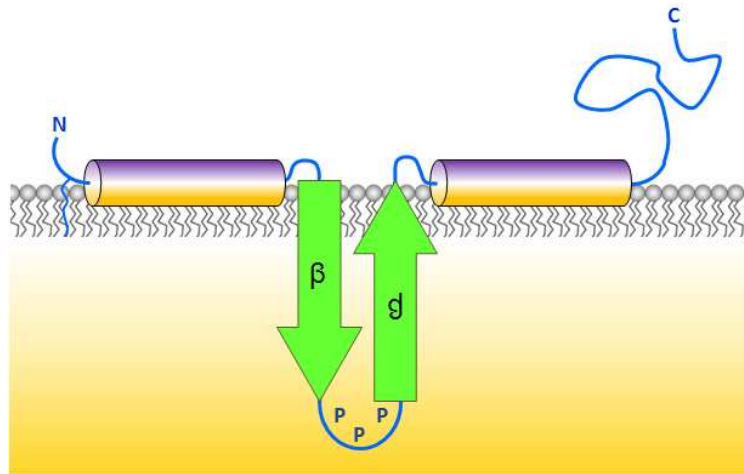


Figure 3-14 : Structure probable des oléosines. Le domaine N-terminal et C-terminal ont des propriétés amphipatiques permettant leur association aux phospholipides des corps lipidiques. Le domaine central, hydrophobe, formerait une structure en épingle à cheveux stabilisée par un coude formé de prolines.

Les oléosines sont principalement exprimées dans les graines. Elles permettent de stabiliser les corps lipidiques pour éviter leur coalescence lors de la déshydratation de la graine [267], [269]. En plus de leur effet surfactant, les oléosines pourraient avoir des fonctions de régulation de la lipolyse ou de la lipogenèse [270].

L'association forte et spécifique des oléosines est à la base de techniques de purification de protéines recombinantes dans les plantes [271]. La fusion avec une oléosine permet d'associer la protéine transgénique aux corps lipidiques. Les corps lipidiques sont facilement purifiables par centrifugation ce qui permet d'obtenir rapidement une fraction enrichie en protéine recombinante.

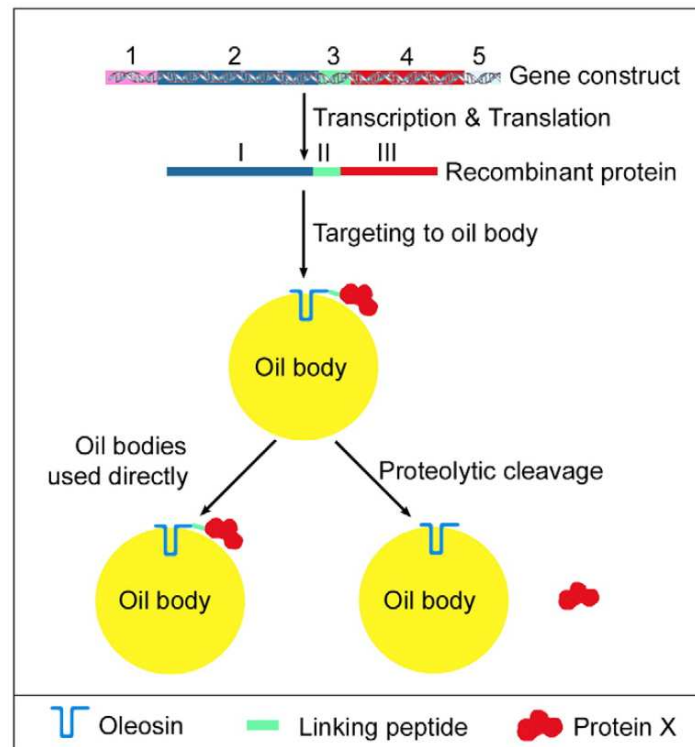


Figure 3-15 : Principe de purification d'une protéine recombinante basée sur l'affinité des oléosines pour les corps lipidiques (*oil body*) [271]. 1 : promoteur (constitutionnel, fort ou inducible) ; 2 et I : oléosine ; 3 et II : *linker* pouvant comporter un site de clivage protéolytique ; 4 et III : protéine recombinante ; 5 : terminateur.

3.3 Lipides, trafic et pathologies

3.3.1 Détournement pathologique du trafic intracellulaire

Pathologies affectant le réticulum endoplasmique

Le réticulum est l'organelle spécialiste des synthèses. Ses pathologies peuvent être divisées en trois groupes [272], [273] (Tableau 3-1) :

1. pathologies de dégradation anormale des protéines ;
2. pathologies de rétention anormale de protéines dans le réticulum, induisant un signal d'apoptose ;
3. défauts dans le fonctionnement du réticulum.

Dans les pathologies du premier groupe, une mutation sur une protéine induit sa dégradation par les voies *normales* de contrôle du réticulum endoplasmique. Par exemple, dans le cas de la mucoviscidose, une mutation à la position 508 de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) induit un défaut de repliement de la protéine et sa dégradation par la voie de dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD, *ER Associated Degradation*). Lorsque la mutation n'empêche pas la fonction de la protéine (site actif d'une enzyme par exemple), la protéine peut être stabilisée par des chaperonnes chimiques, empêchant la dégradation par la voie ERAD.

Dans les pathologies du deuxième groupe, la protéine est traduite normalement mais est retenue dans le réticulum endoplasmique. Par exemple, chez les patients atteints de la maladie de Pelizaeus Merzbacher (Tableau 3-1), une mutation sur la lipophiline (PLP1) empêche son export normal à la périphérie. L'accumulation de PLP1 dans le réticulum induit la mort par apoptose des oligodendrocytes, à l'origine de la démyélinisation des motoneurones (leucodystrophie) [274]. Ce mécanisme est retrouvé dans le cas de la maladie d'Alzheimer (cf. 3.3.4 ci-dessous). L'accumulation du peptide amyloïde β dans le réticulum endoplasmique induit l'activation de la voie UPR (*Unfolded Proteins Response*). Or l'activation prolongée de la voie UPR conduit à l'apoptose médiée par les mitochondries [275], [276].

Enfin les pathologies du troisième groupe sont des pathologies causées par une mutation dans une protéine de la voie sécrétoire. L'arthropathie pseudorhumatoïde progressive infantile (dysplasie spondiloepiphysaire congénitale) est causée par une mutation dans le gène SEDL [277]. L'homologue de SEDL chez la levure est p20, un composant du complexe TRAPP, facteur d'échange de la petite protéine G Sar1. Dans les ostéoblastes, SEDL/p20 serait nécessaire pour l'export du procollagène du réticulum endoplasmique vers le Golgi. L'absence de SEDL induit une rétention du collagène dans le réticulum (et donc un déficit de collagène dans la matrice osseuse, à l'origine des déformations (dysplasies)).

Tableau 3-1 : Exemples de maladies monogéniques affectant le réticulum endoplasmique [272], [273].

nom	protéine	description	Incidence ^(a)	OMIM
Groupe I : Pathologies de dégradation				
mucoviscidose	CFTR	Accumulation de mucus dans les poumons et les voies digestives, atteinte pancréatique	≈1/2 500	#219700
déficit en AAT	α_1 -antitrypsine	Emphysème : destruction des voies aériennes inférieures	≈1/5 000	#613490
hémochromatose génétique	HFE	Accumulation de fer entraînant asthénie, arthralgies et atteintes hépatiques	≈1/300	#235200
albinisme oculo-cutané de type I	tyrosinase	Défaut de synthèse de mélanine cutanée associé à des troubles oculaires	≈1/40 000	#203100
déficit congénital en protéine C	protéine C	Thromboses veineuses récurrentes	≈1/500 000	#176860
angioedème héréditaire	C1 inhibiteur	Œdème récidivant des voies respiratoires et du tube digestif	≈1/100 000	#106100
maladie de Tay-Sachs	hexosaminase A	Maladie neurodégénérative conduisant à une ataxie	≈1/320 000	#272800
intolérance aux disaccharides	sucrase-isomaltase	Malabsorption intestinale des oligosaccharides et des disaccharides	≈1/5 000	#222900
syndrome de Crigler-Najjar	bilirubine UGT	Ictère évoluant vers une encéphalopathie	≈1/1 000 000	#218800
Groupe II : Pathologies de rétention				
ostéogenèse imparfaite	collagène de type 1	Fragilité osseuse liée à un défaut de sécrétion du collagène	≈1/10 000	#166200 #166210 #166220 #259420
Déficit congénital en fibrinogène	fibrinogène	Défaut de coagulation lié à l'absence de fibrinogène circulant	≈1/1 000 000	#202400
maladie de Charcot-Marie-Tooth type 1	PMP22	Atrophie musculaire et insensibilité périphérique liée à une démyélinisation neuronale	≈1/2 500	#118220
maladie de Pelizaeus Merzbacher	lipophiline (PLP1)	Leucodystrophie entraînant une ataxie et une tétraplégie	≈ 1/400 000	#312080
maladie de von Willebrand type II	facteur Willebrand (vWF)	Hémorragies récurrentes	≈1/10 000	#613554
Groupe III : Pathologie du réticulum endoplasmique				
déficit combiné en facteurs V et VIII	ERGIC53/p58	Troubles de la coagulation entraînant des hémorragies et des ecchymoses	≈1/100 000	#227300
Arthropathie pseudorhumatoïde progressive infantile	SEDL (sedlin)	Malformation de l'épiphyse (extrémité de l'os) avec une atteinte des articulations	≈1/1 000 000	#208230

(a) Source : www.orpha.netHFE : *hight fer* protein (hémochromatose)

UGT : Uridine-diphosphate Glucuronosyl Transférase

PMP22 : *Peripheral Myelin Protein 22*

Pathologies de défaut du trafic

Un défaut dans le trafic intracellulaire peut conduire à une mauvaise localisation d'une protéine non mutée, empêchant sa fonction.

La choroïdérémie est caractérisée par une dystrophie chorio-rétinienne (la choroïde est la couche de soutien, vascularisée, située sous la rétine) évoluant vers la cécité (www.orpha.net). Chez les patients masculins, la protéine Rep1 est déficiente. Rep1 (*Rab Escort Protein 1*) est une Rab-géranlygéranyl transférase permettant d'assurer la prénylation des petites protéines G Rab [278]. La prénylation des Rab est essentielle pour leur fonction. La perte de la prénylation des Rab dans l'œil induit un défaut de sécrétion des photorécepteurs conduisant à

la dégénérescence de la rétine. Dans les autres cellules Rep2, un homologue de Rep1, peut compenser la perte de Rep1. Le rétablissement de l'expression de Rep1 permet de rétablir l'expression des photorécepteurs [279].

Le défaut de trafic peut aussi reposer sur un défaut de la translocation de protéines au sein de leur compartiment de destination. Par exemple, un déficit dans les protéines de l'import peroxysomal (Pex) conduit à un défaut de la translocation de certaines enzymes peroxysomales (syndrome de Zellweger, chondrodysplasie ponctuée rhizomélique) [272]. Le nombre et la fonction des peroxysomes sont affectés, causant des néphropathies et des atteintes osseuses et neurologiques.

Les défauts du trafic intracellulaire vont affecter toutes les cellules, à des degrés divers conduisant à des défaillances multi-systémiques. Par exemple, le syndrome de Lowe est caractérisé par des anomalies des yeux, du système nerveux et des reins et est causé par le déficit de la protéine OCRL1 (oculo-cérébro-rénal syndrome de Lowe). OCRL1 est une $\text{PtIns}4,5\text{P}_2$ 5-phosphatase permettant de former le $\text{PtIns}4\text{P}$. Une accumulation de $\text{PtIns}(4,5)\text{P}_2$ dans les cellules des patients provoque un défaut de signalisation intracellulaire à l'origine de défaut dans le trafic et dans la ciliogenèse rénale [280].

3.3.2 Les pathologies des lipides

Anomalie de la lipidémie et de la lipoprotéïnémie

Les dyslipidémies (anomalies de la formule lipidique sanguine) peuvent concerner le taux de cholestérol total (CT) - dans l'une ou l'autre des ses fraction (HDL ou LDL) ou concerner le taux de triacylglycérols (ou *triglycérides*).

Tableau 3-2 : Recommandations de la haute autorité de santé sur les valeurs de la lipidémie chez un individu sain.

	Recommandations (HAS)
Cholestérol total	< 2 g/L
HDL	compris entre 0,4 g/L et 0,6 g/L
LDL	< 2,2 g/L
Trigacylglycérols	< 1,5 g/L

Les hypolipidémies (taux faibles de lipides sanguins) sont des maladies génétiques rares qui peuvent être classées en deux groupes : les hypoalphalipoprotéïnémies (déficit en ApoA) et les hypobétalipoprotéïnémies (déficit en ApoB). Les hypolipidémies légères sont souvent asymptomatiques. Cependant, dans le cas de défauts majeurs de sécrétion des lipoprotéines, les patients peuvent présenter une hépatomégalie, des atteintes neurologiques, musculaires ou ophtalmiques.

La maladie de Tangier est une hypoalphalipoprotéïnémie liée à un défaut de formation des HDL dans le plasma. Les patients présentent une accumulation de cholestérol dans le foie, la rate et les intestins (www.orpha.net) ainsi qu'une hypertriglycéridémie. Le défaut de sécrétion du cholestérol dans le plasma, lié à un déficit du transporteur ABCA1, ne permet pas la formation des HDL.

La maladie d'Anderson est un défaut d'absorption des lipides alimentaires caractérisée par une malnutrition, un retard de croissance, un déficit en vitamine E

avec des complications hépatiques, neurologiques et ophtalmologiques (www.orpha.net). Les patients présentent une hypobétalipoprotéïnémie liée à un défaut de sécrétion postprandiale de la protéine apoB-48 par les entérocytes. Ainsi, les entérocytes présentent une accumulation de larges gouttelettes lipidiques [281]. Le défaut de sécrétion des chylomicrons est lié à une mutation dans Sar1B, affectant le transport des chylomicrons naissants entre le réticulum endoplasmique et le Golgi [281].

Les dyslipidémies dépistées sont donc principalement celles présentant un taux élevé de cholestérol ou de triacylglycérols. L'hypercholestérolémie (taux élevé de cholestérol dans le sang) peut être primaire (origine familiale, héréditaire) ou secondaire (maladie acquise). Dans tous les cas, un excès chronique de cholestérol dans le sang favorise le dépôt de plaques d'athérome dans les artères, principal facteur de risque des accidents cardiovasculaires thromboemboliques. Le traitement repose sur une prise en charge alimentaire de l'individu, le cas échéant un traitement médicamenteux à base de statines peut être proposé.

Une hypertryglycémie (taux élevé de triacylglycérols dans le sang) est un facteur de risque cardiovasculaire, à fortiori lorsqu'il est associé à une hypercholestérolémie. Seule, l'hypertryglycémie peut conduire à une pancréatite (inflammation du pancréas). Le traitement repose sur une prise en charge alimentaire adaptée (régime).

Le contrôle des hyperlipidémies est un problème majeur de santé publique. Les dyslipidémies ne sont dépistées qu'après la survenue d'un accident cardiovasculaire (AVC, cardiopathies, etc.) et sont souvent associées à d'autres facteurs de risque (obésité, tabagisme, sexe, âge, hypertension artérielle, sédentarité). Certains aliments dits *hypolipémisants* permettraient de diminuer les taux de lipides sanguins. Cependant, les effets mesurés sont faibles au regard des doses testées. La meilleure prévention contre les complications d'une dyslipidémie est un régime alimentaire varié et une hygiène de vie équilibrée (!).

Maladies lysosomiales

Les maladies lysosomiales sont des maladies d'accumulation d'un ou plusieurs métabolites, liées au déficit total ou partiel d'une enzyme lysosomale. Les maladies lysosomiales peuvent affecter les voies de dégradation des glucides ou des glycoprotéines (glycoprotéinoses) ou les voies de dégradation des lipides (lipidoses) [282]. La gravité de la maladie dépend de l'âge de survenue des premiers signes. Ainsi, il est courant de distinguer, pour chaque maladie, une forme infantile grave (se déclarant dans les premiers jours ou semaines de vie avec une espérance de vie réduite), une forme juvénile intermédiaire et une forme adulte dite modérée (se déclarant à l'âge adulte et de progression lente).

Les lipidoses associées à une accumulation lysosomale sont des maladies affectant le système neuronal (leucodystrophies associées à un défaut du métabolisme des sphingolipides) ainsi que les organes internes (organomégalies) (Tableau 3-3) [282]. Des signes cliniques associés faisant penser à une maladie lysosomiale (atteintes neurodégénératives associées à une organomégalie par exemple) peuvent être diagnostiquées par le dosage de l'activité enzymatique dans les lymphocytes (prise de sang) ou une culture de fibroblastes (biopsie de peau). Le

traitement est, dans la plupart des cas, symptomatique. Cependant, l'injection d'une enzyme recombinante permet de restaurer une activité enzymatique normale permettant de diminuer les symptômes pour (protocole national de diagnostic et de soins, HAS) :

- la maladie de Gaucher (imiglucérase),
- la maladie de Fabry (agalsidase alpha ou agalsidase bêta).

Tableau 3-3 : Quelques maladies lysosomiales d'accumulation de lipides (www.orpha.net) [282].

pathologie	OMIM	description	enzyme	lipide accumulé
maladie d'Austin leucodystrophies métachromatiques	#250100	maladie neuro-dégénérative	arylsulfatase A	cérébrosides sulfates
céroïde-lipofuscinose neuronales (CLN1-11) (maladie de Batten)	-	maladies neuro-dégénératives avec dégénérescence rétinienne	-	lipide autofluorescent
maladie de Fabry	#301500	douleurs diffuses chroniques avec atteintes rénales	α -galactosidase A	glucosylcéramide (Gb3)
maladie de Farber	#228000	accumulation de lipides dans des nodules articulaires douloureux, associée à une hépatosplénomégalie	céramidase	céramides
gangliosidose à GM1	#230500 #230600	atteintes neuro-viscérales et ophtalmologiques avec dysmorphie faciale	β -galactosidase	ganglioside GM1
maladie de Gaucher (type I-III)	#230800 #230900 #231000	hépatosplénomégalie associée à des atteintes osseuses et une cytopénie	glucocérébrosidase	glucosylcéramides
maladie de Krabbe	#245200	leucodystrophie	galactosylcéramidase	galactosylcéramides
maladie de Niemann-Pick type A et B	#257200 #607616	maladie neurodégénérative (type A) atteintes multi-viscérales (foie, rate, poumon) (type B)	sphingomyelinase	sphingomyélines
gangliosidose à GM2 variante B (maladie de Tay-Sachs)	#272800	ataxie et mégaencéphalie conduisant au décès dans un état de décérébration	hexosaminidase A	ganglioside GM2
maladie de Wolman	#278000	hépatosplénomégalie majeure avec calcifications des surrénales, cachexies et anémie sévère	lipase acide	ester de cholestérol et triglycérides
maladie de Niemann-Pick type C	#257220	atteinte neurologique progressive (ataxie cérébelleuse) avec hépatosplénomégalie	NPC1 / NPC2	cholestérol

Dans le cas de la maladie de Niemann-Pick type C, la mutation porte sur le gène *NPC1* ou *NPC2*. NPC1 est une protéine transmembranaire située dans la membrane des lysosomes et des endosomes tardifs. NPC2 est une protéine soluble qui interagit avec NPC1 sur les lysosomes et les endosomes tardifs et avec le récepteur du réticulon 4B (NgBR) localisée dans le réticulum endoplasmique [283]. NPC1 et NPC2 forment avec NgBR un site de contact entre les lysosomes / endosomes tardifs et le réticulum endoplasmique favorisant un transfert direct du cholestérol du lysosome vers le réticulum endoplasmique par la protéine ORP5 (*OSBP-related protein*) apparentée aux protéines fixant l'oxystérol (*OSBP, oxysterol binding protein*) [284].

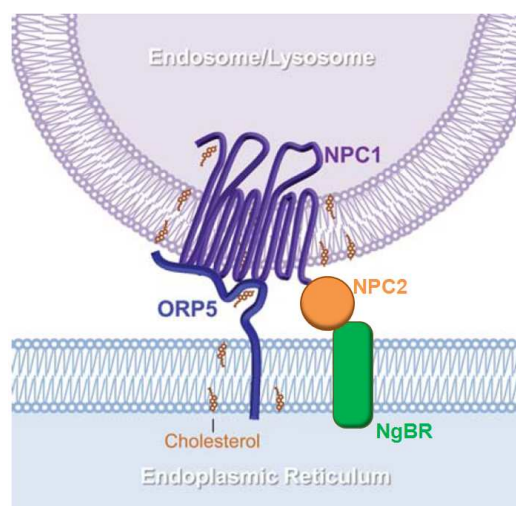


Figure 3-16 : Principe du transfert du cholestérol des endosomes tardifs / lysosomes vers le réticulum endoplasmique (modifié d'après [284]). NPC2 interagit avec le récepteur du réticulum 4B localisé sur le réticulum endoplasmique (NgBR, *nogo-B receptor*) et NPC1. Le cholestérol est transféré *via* NPC1 et la protéine ORP5 (OSBP(*oxysterol binding protein*)-*related protein*) du lysosome vers le réticulum endoplasmique.

Autres lipidoses

Une lipidose est une maladie d'accumulation de lipides. Le métabolisme des lipides a lieu dans plusieurs organelles cellulaires : le réticulum endoplasmique synthétise la plupart des précurseurs qui sont pour certains maturés dans le Golgi. La dégradation des lipides se fait dans les peroxysomes, les lysosomes et les mitochondries. Une mutation affectant l'une des étapes du métabolisme des lipides peut entraîner une lipidose.

Le syndrome de Sjögren-Larson (SLS, *Sjörgren-Larson syndrome*) est une ichtyose (dystrophie cutanée caractérisée par une desquamation) associée à un retard mental et une tétraplégie [285]. Le SLS est causé par un déficit de la FALDH (*fatty aldehyde dehydrogenase*) qui catalyse l'oxydation des aldéhydes gras en acides gras [285]. La FALDH est une enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique permettant l'oxydation des alcools gras alimentaires.

Le syndrome épileptique infantile type Amish est causé par un déficit de la sialyltransférase-9 localisée dans le Golgi, induisant un défaut de synthèse du ganglioside GM3. Ce syndrome est caractérisé par un retard mental, une épilepsie, et des atteintes ophtalmiques.

Le syndrome de Refsum est une leucodystrophie touchant la rétine, le cerveau et le système nerveux périphérique. Les signes cliniques associent une ataxie, une atteinte rétinienne pouvant conduire à la cécité et une ichtyose. Le syndrome de Refsum est causé par l'accumulation d'acide phytanique [286], [287] (lipide terpenoïde à 20 carbones) (Figure 3-17) apporté exclusivement par l'alimentation. Cette accumulation est causée par un déficit en phytanoyl-CoA hydroxylase qui permet la dégradation de l'acide phytanique dans les peroxysomes (α -oxydation) [288]. L'amélioration des symptômes peut être obtenue par une exclusion alimentaire de l'acide phytanique.

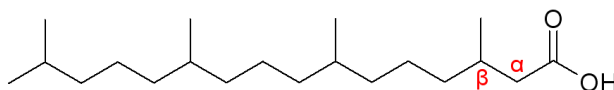


Figure 3-17 : Structure de l'acide phytanique montrant la position des carbones α et β . La β -oxydation de cet acide gras n'est pas possible en raison de la présence d'un groupement méthyle sur le carbone β .

Un défaut de dégradation des triacylglycérols peut conduire à une accumulation de triacylglycérols dans des vacuoles cytoplasmiques, retrouvée dans plusieurs types cellulaires. Le syndrome de Chanarin-Dorfman est une lipidose avec surcharge en triglycérides (NLSDi, *neutral lipid storage disease with ichthyosis*) caractérisée par une ichtyose congénitale, une hépatomégalie et une myopathie modérée. La NLSDi est causée par un déficit de la CGI-58 [289]. La NLSDm est caractérisée par une *myopathie* et une cardiomyopathie, sans ichtyose ; et est causée par un déficit de la lipase associée aux adipocytes (ATGL, *adipocytes triglyceride-lipase*) [289]. ATGL est une triacylglycérol lipase catalysant la première étape de l'hydrolyse des triacylglycérols contenus dans les gouttelettes lipidiques. CGI-58 est un régulateur d'ATGL.

3.3.3 Maladies infectieuses

Infections bactériennes, exemple des Chlamydia

Certaines bactéries (Tableau 3-4) ont un cycle de développement intracellulaire obligatoire ou facultatif. La croissance intracellulaire offre de nombreux avantages : accès à des ressources alimentaires (*Chalydiae* ou *Rickettsiaceae*), protection, échappement au système immunitaire. Le mode de vie intracellulaire est répandu dans plusieurs classes (Tableau 3-4). Les cellules infectées sont, pour la plupart, des cellules eucaryotes (unicellulaire ou pluricellulaire). L'association entre une bactérie et une cellule eucaryote peut être pathologique (cas des infections à *Rickettsia* chez les mammifères par exemple) ou symbiotique (cas des associations symbiotiques entre *Paramecium* et *Holospira* [290]). La présence du symbiote peut en revanche conférer à l'hôte des facteurs de virulence ou de résistance (l'onchocercose (cécité de rivières) est causée par les nématodes du genre *Onchocera* hébergeant des symbiotes de la famille des *Rickettsiaceae* (*Wolbachia*) [291], [292])

Deux stratégies sont employées par les bactéries intracellulaires :

1. Les bactéries cytoplasmiques induisent la lyse des phagosomes pour être libres dans le cytosol. Ces bactéries se déplacent dans le cytosol en polymérisant des comètes d'actine [293], [294].
2. Les bactéries vacuolaires restent pendant tout leur cycle de réplication dans les vacuoles délimitées par une membrane. Les bactéries modulent les voies de trafic intracellulaire pour créer des niches favorables à leur croissance en inhibant la fusion des phagosomes avec les lysosomes [295].

Tableau 3-4 : Exemples d'eubactéries ayant un cycle intracellulaire obligatoire ou facultatif.

Phylum	Classe	Ordre	Famille	exemple d'espèce (pathologie associée)	Réf.
Protéobacteria	α-protéobacteria	Rickettsiales		<i>Rickettsia prowazekii</i> (thyphus exanthématique)	[296]
			Rickettsiaceae	<i>Rickettsia conorii</i> (fièvre de Marseilles)	[294], [296]
				<i>Wolbachia pipientis</i>	[291]
		Rhizobiales	Anaplasmataceae	<i>Ehrlichia chaffeensis</i> (ehrlichiose)	[291]
			Holosporaceae	<i>Holospora undulata</i>	
	β-protéobacteria	Burkholderiales	Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (galle (plantes))	
			Brucellaceae	<i>Brucella melitensis</i> (brucellose)	
		Legionellales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (mélarioïdose)	[294], [297]
			Alcaligenaceae	<i>Bordetella pertussis</i> ^(a) (coqueluche)	
			Legionelleceae	<i>Legionelle pneumophila</i> (maladie du Légionnaire)	[295], [298]
Firmicutes	γ-protéobacteria	Enterobacteriales	Coxiellaceae	<i>Coxiella burnetii</i> (fièvre Q)	[295], [298], [299]
				<i>Yersinia pestis</i> (peste)	[300]
		Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Salmonella enterica</i> (salmonellose)	[295]
	ε-protéobacteria	Xanthomonales		<i>Shigella flexneri</i> (shigellose)	
			Francisellaceae	<i>Francisella tularensis</i> (tularémie)	[301]
		Campylobacteriales	Helicobacteraceae	<i>Helicobacter pylori</i> (ulcers gastriques)	[295]
Firmicutes	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (trachéobronchites)	[299]
				<i>Ureaplasma urealyticum</i> ^(b) (infections uro-génitales)	
	Bacilli	Bacillales	Listeriaceae	<i>Listeria monocytogenes</i> (listériose)	[293], [295]
	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium botulinum</i> ^(a) (botulisme)	
Actinobacteria ^(c)		Actinomycetales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (tuberculose)	[295]
Chlamydiae ^(c)		Chlamydiales	Chlamydiaceae	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (pneumopathie)	

(NB : liste non exhaustive)

(a) bactérie sécrétant une toxine ayant pour cible une protéine du trafic intracellulaire

(b) bactérie saprophyte

(c) Pour ces deux classes, le nom de classe et nom de phylum est confondu

Le genre *Chlamydiae* présente une large diversité, récemment découverte grâce aux outils de biologie moléculaire (plus de la moitié des familles a été recensée après 2004) (Figure 3-18) [302]. Les *Chlamydiae* sont des eubactéries qui présentent toutes la particularité d'être des parasites intracellulaires obligatoires. Chez les amibes, les *Chlamydiae* existeraient sous forme de symbiotes avirulents, ce qui constituerait un réservoir [303]. Les *Chlamydiae* infectent toutes les espèces eucaryotes des mammifères aux amibes [302]. En revanche aucun *Chlamydiae* ne semble infecter les cellules végétales.

Deux espèces sont bien connues pour infecter l'Homme [304] : *C.pneumoniae* qui provoque des infections des voies respiratoires hautes et basses, le plus souvent bénignes et très répandues, et *C.trachomatis* provoque des infections

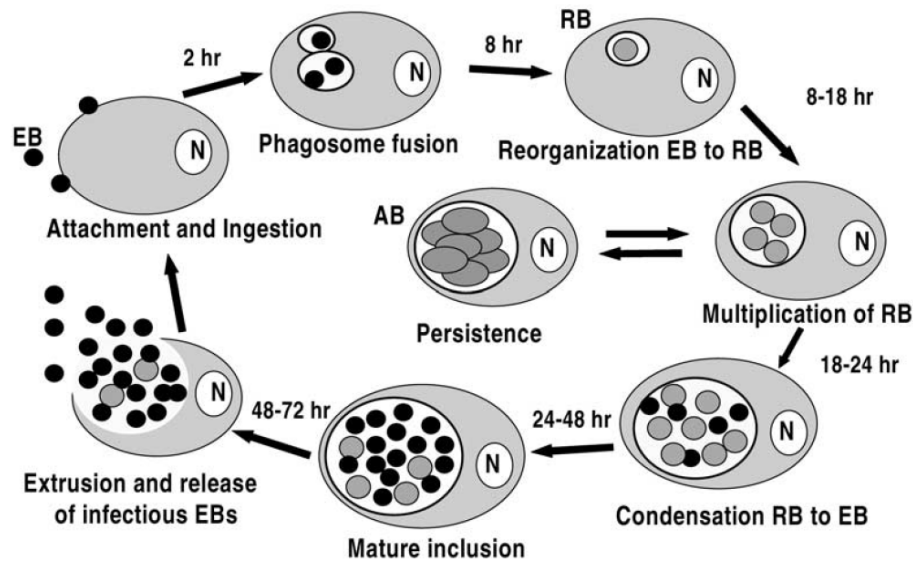


Figure 3-19 : Cycle de vie des *Chlamydiae* [305]. Le cycle commence par l'attachement de la bactérie sous sa forme de corps élémentaire (EB) sur la cellule cible *via* des récepteurs spécifiques induisent la phagocytose de la bactérie (processus actif de la cellule). La fusion des phagosomes permet de former une large vacuole permettant la croissance des bactéries sous leur forme de corps réticulé (RB). Dans certains cas, une phase de latence (ou persistance) peut être observée. La maturation des inclusions de *Chlamydia* implique la condensation des corps réticulés en corps élémentaires, ensuite libérés par lyse de la cellule (dans les cas pathologiques) ou sécrétion (dans le cas d'endosymbiose). N : noyau ; AB : corps aberrant.

Dans la cellule, la bactérie réside dans une vacuole délimitée par une membrane (inclusion) (Figure 3-19). La membrane des inclusions est dépourvue de marqueur cellulaire et est déconnectée du trafic endosomal. Ainsi, il n'y a pas de fusion avec les lysosomes [305].

Le séquençage de plusieurs représentants du genre [308] montre que les voies de biosynthèse des cofacteurs, les voies de biosynthèse des acides aminés et dans certains cas les voies de synthèse des nucléotides sont absentes. En revanche, les voies de la glycolyse et du pentose phosphate semblent être présentes et fonctionnelles [305]. Les *Chlamydiae* nécessitent des lipides synthétisés par la cellule hôte comme les sphingomyélines et le cholestérol. Ces lipides sont récupérés dans les inclusions soit par détournement de vésicules, soit par recrutement de CERT sur les membranes des inclusions [309].

Infections virales, exemple du virus de l'hépatite C

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. Ils ne forment pas un groupe homogène, leur diversité n'est pas encore totalement établie. Leur longue co-évolution avec la cellule hôte a permis de sélectionner des mécanismes d'interaction avec les machineries cellulaires complexes et inédits. Ainsi, les virus des cellules eucaryotes doivent gérer la compartimentalisation de la cellule hôte. Pour cela, les virus à ARN simple brin de polarité positive (comme le virus de l'hépatite C, VHC) sont capables de détourner les membranes internes pour créer de véritables usines virales nécessaires à leur réplication.

L'hépatite C est un problème de santé publique majeur ; plus de 170 millions de personnes sont chroniquement infectées dans le monde (OMS). Malgré les efforts de recherche, aucun vaccin n'est disponible et le traitement standard (bithérapie

par la ribavirine et l'interféron pegylé) n'est efficace que pour la moitié des personnes infectées. L'infection par le VHC conduit à une stéatose hépatique et des anomalies de la formule lipidique sanguine [310], [311]. La stéatose hépatique est l'un des facteurs de risque de la cirrhose et de l'hépto-carcinome.

Le VHC fait partie de la famille des *Flaviviridae* et est le seul membre des *Hepacivirus* à infecter l'homme. Le VHC est un virus enveloppé à ARN de polarité positive de 50 nm de diamètre. L'ARN viral est traduit en une polyprotéine qui est ensuite clivée en trois protéines structurales (E1, E2 et Core) et sept protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) [312] (Figure 3-20).

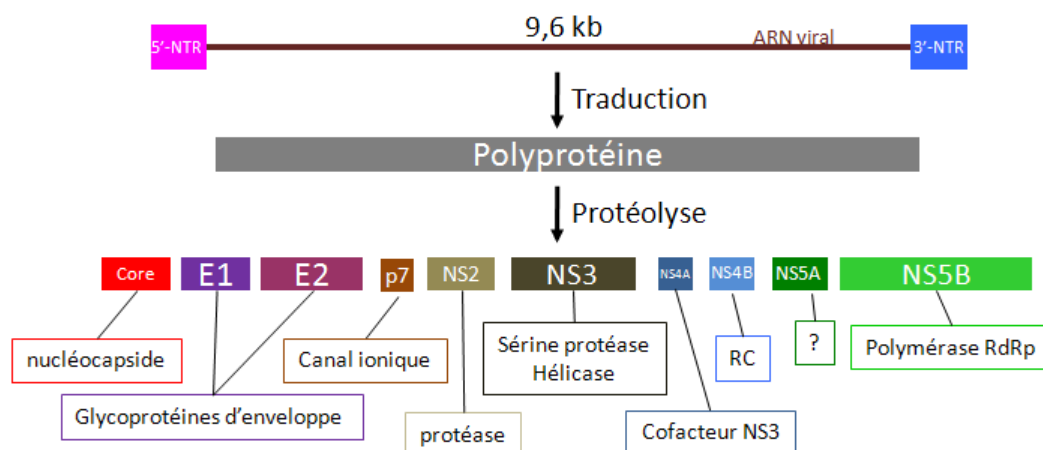


Figure 3-20: Traduction des protéines virales du VHC (modifié d'après Moradpour et al., 2007). RC = complexe de réplication RdRp = RNA-dependant-RNA-polymérase NTR = région non codante

Depuis sa découverte en 1989, de grandes avancées ont été réalisées dans la compréhension du cycle infectieux du VHC notamment grâce à la mise au point d'un modèle infectieux *in vitro* [313]. L'infection de l'hépatocyte par le VHC conduit à la formation d'une usine virale (*membranous web*), composée de membranes cellulaires dérivées du réticulum endoplasmique, intriquées avec des gouttelettes lipidiques et comprenant l'ARN et toutes les protéines virales [314]. Cette réorganisation des membranes internes est causée par NS4B et est nécessaire pour la réplication virale. Les études de l'interactome du VHC [315] indiquent que les partenaires cellulaires des protéines virales (principalement NS3, NS5A et Core) sont majoritairement impliqués dans les voies du métabolisme des lipides et du trafic vésiculaire, incluant COPI, PI4KIII α et PI4KIII β [316] ; suggérant un rôle du système GBF1-Arf1 dans la mise en place du complexe de réplication [56].

3.3.4 Lipides et facteurs de risque

La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neuro-dégénérative liée à l'âge. C'est la démence (perte des capacités cognitives portant atteinte à l'autonomie de la personne) incurable la plus fréquente chez l'Homme (Figure 3-21) [317]. Les symptômes de démence progressive, perte de mémoire et perte des facultés cognitives, ont été décrits pour la première fois par Aloïs Alzheimer, neuropsychiatre allemand, en 1906. La maladie toucherait aujourd'hui près de 25

millions de personnes dans le monde [317]. L'incidence et la prévalence de la maladie augmentent avec l'âge (Figure 3-21). Ainsi l'augmentation de la prévalence mesurée ces dernières années pourrait être corrélée à l'augmentation de l'espérance de vie.

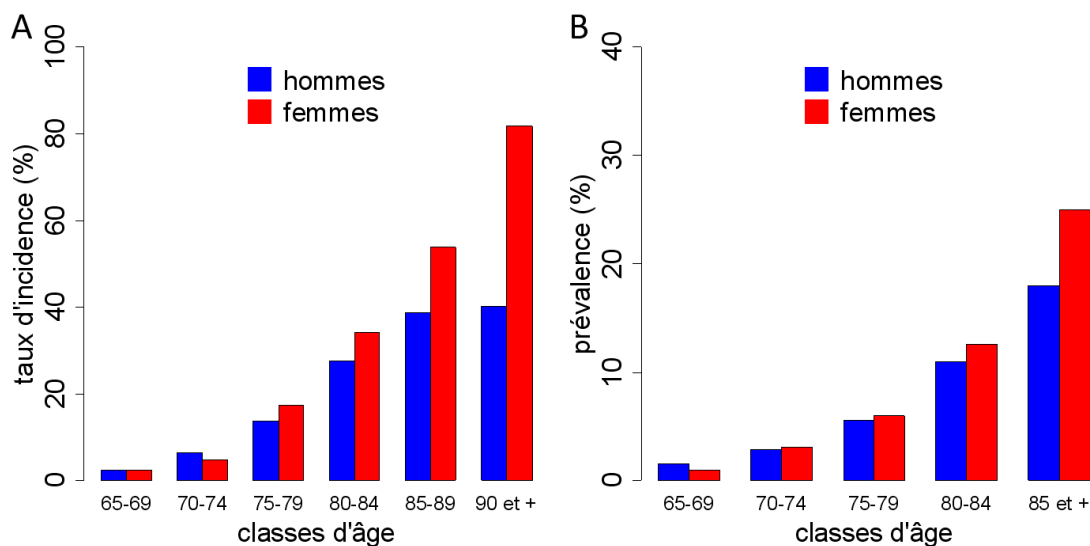


Figure 3-21 : Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer en Europe [317]. (A) Incidence en fonction de l'âge (risque de développer la maladie) ; (B) prévalence en fonction de l'âge (nombre de personnes atteintes dans la population totale à un moment donné).

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux types de lésion dans le cerveau induisant une destruction massive des neurones du cortex et de l'hippocampe par apoptose. Deux types de lésions sont reportés : le dépôt extracellulaire d'agrégats de peptide amyloïde β ($A\beta$) (plaques séniles) et le dépôt intracellulaire de protéines tau hyperphosphorylées (neurofibrilles).

Le précurseur des plaques amyloïdes (APP, *β -amyloid precursor protein*) est une protéine à un domaine transmembranaire localisée à la membrane plasmique. En condition non pathologique, APP est clivée par une α -sécrétase et une γ -sécrétase en trois fragments : les peptides solubles APPs α et p3 et le peptide intracellulaire AICD (Figure 3-22). En condition amyloïdogène, APP est clivée par une β -sécrétase [318] et une γ -sécrétase en trois fragments : le peptide extracellulaire soluble APPs β , le peptide intracellulaire AICD et le peptide amyloïde β ($A\beta$) (Figure 3-22) [319], [320]. Le peptide $A\beta$ forme des plaques amyloïdes dans le cerveau (plaques séniles) induisant l'apoptose des neurones [321–323]. L'apoptose induite par les plaques amyloïdes $A\beta$ pourrait être causée par l'interaction du peptide $A\beta$ avec la membrane plasmique [324] ou les lipides membranaires (cholestérol) [322], [325].

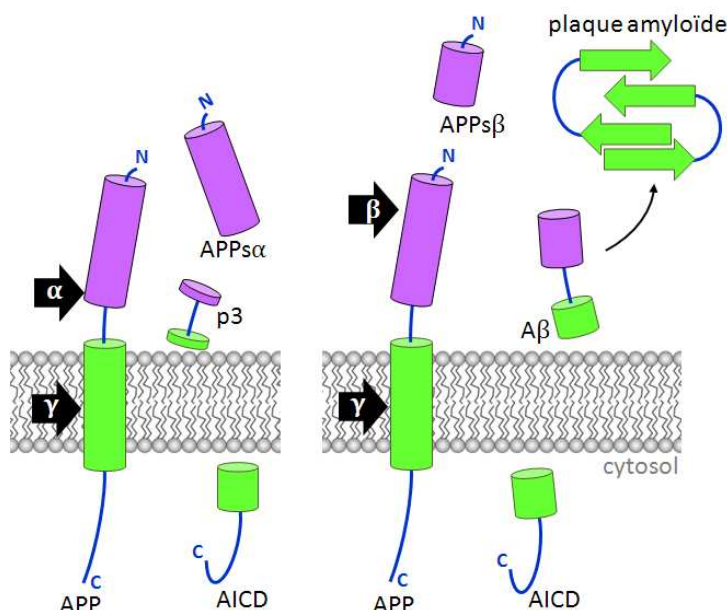


Figure 3-22 : Protéolyse amyloïdogénique et non-amyloïdogénique du précurseur des plaques amyloïdes (APP) [319]. Dans la voie non amyloïdogénique (à gauche), APP est clivée par une α -sécrétase (α) qui forme un peptide soluble (APPs α). Le segment transmembranaire résiduel est ensuite clivé par une γ -sécrétase (γ) permettant de former le peptide soluble p3 non pathologique et le fragment C-terminal intracellulaire AICD. Dans la voie amyloïdogénique (à droite), APP est clivée par une β -sécrétase (β) qui libère le peptide soluble (APPs β). Le segment transmembranaire résiduel est ensuite clivé par une γ -sécrétase (γ) permettant de former le peptide amyloïde β (A β) pathologique et le fragment C-terminal intracellulaire AICD.

La protéine tau est une protéine de liaison aux microtubules dont elle promeut la polymérisation. Six isoformes issues d'épissage alternatif sont exprimées dans le cerveau humain [326]. L'activité de la protéine tau est modulée par phosphorylation (45 sites de phosphorylation ont été décrits). Cependant, l'hyperphosphorylation de tau induit une diminution de son affinité pour les microtubules et induit la formation d'agrégats insolubles dans le cytoplasme [326], [327]. L'accumulation d'agrégats de tau induit un stress intracellulaire à l'origine de l'activation de la voie de l'apoptose provoquée par la mitochondrie [326], [328], [329].

Bien qu'il existe des prédispositions génétiques dans certaines formes précoces de maladie d'Alzheimer, la majorité des cas est une forme sporadique de la maladie. Le rôle de facteurs externes est ainsi fréquemment discuté. En 2003, une corrélation entre l'hypercholestérolémie et le risque de développer la maladie d'Alzheimer a été montrée [330]. Le cholestérol et l'apoprotéine E (apoE) jouent un rôle dans la toxicité induite par les plaques A β [322], [325], [330], [331], sans que les mécanismes n'en soient élucidés.

Les cancers

Les cancers sont la première cause de mortalité chez l'Homme depuis la fin des années 80. Un cancer est une prolifération clonale, anormale et hors de contrôle d'une cellule transformée, au sein d'un tissu. Les cancers ont pour origine des facteurs internes (génétique, infection virale) ou externe (tabagisme, irradiation, exposition à des polluants industriels reconnus cancérigènes, etc.). Les cancers sont classés selon l'origine de la cellule transformée. Parmi les cancers *solides*, les

sarcomes sont des cancers du tissu conjonctif (tissu de soutien) et les carcinomes sont des cancers des épithéliums. Il y a presque autant de cancer que de type cellulaire. Cependant, certains sont plus fréquents – prostate chez l'homme, sein chez la femme, poumon et colon-rectum.

Certaines formes familiales de cancer sont des maladies monogéniques (causées par une mutation dans un gène). La sclérose tubéreuse de Bourneville est une maladie monogénique caractérisée par le développement d'angiofibromes faciaux (tumeurs bénignes des tissus fibreux sur le visage), de tumeurs de Koenen (fibromes péri-unguéaux bénins), et d'angiomyolipomes rénaux (tumeurs bénignes développées à partir de cellules endothéliales, musculaires lisses et contenant de la graisse). Ces manifestations tumorales bénignes sont cependant associées à un retard mental et des atteintes hépatiques, rénales et cardiaques. Il existe deux formes de la maladie générées par deux protéines mutées : TSC1 et TSC2. TSC1 (hamamartin) et TSC2 (tubérine) forment un complexe ayant une activité GAP permettant d'inhiber la protéine G RHEB [332]. RHEB est un régulateur du complexe mTOR, lui-même *master* régulateur de la traduction. L'activation de mTOR par RHEB pourrait aussi avoir un rôle dans la maturation des lysosomes [333].

Le cancer est caractérisé par une instabilité génétique conduisant à l'accumulation de mutations, dont les plus favorables au développement de la tumeur seront sélectionnées. Ainsi, certains cancers montrent une dérégulation des voies de biosynthèse de lipides. Par exemple, l'analyse lipidomique des gliomes (tumeurs cérébrales du tissu de soutien - microglie) montre un profil atypique des gangliosides dans les tumeurs [334–336]. De même, le carcinome pulmonaire montre une dérégulation du contenu en lipides (augmentation de la concentration en lactosylcéramides et gangliosides et synthèse de quatre lipides atypiques) [337]. Le cancer de la prostate (le cancer masculin le plus fréquent) est associé à une hypercholestérolémie. Les cellules tumorales sont enrichies en cholestérol et *in vitro* la croissance des cellules tumorales prostatiques dépend du cholestérol [338].

LRH-1 (*liver receptor homolog-1*) est un récepteur nucléaire ayant un domaine d'activation de la transcription de gènes contrôlant le métabolisme des lipides [339]. LRH-1 possède une affinité pour les phospholipides [340] et sera donc potentiellement activé par la fixation spécifique de phospholipides [341]. LRH-1 est surexprimé dans certains cancers. Dans le cas du cancer du sein, LRH-1 active l'expression de gènes de la synthèse des œstrogènes, augmentant ainsi la concentration locale en hormone. Dans le colon, LRH-1 permet d'augmenter l'expression des gènes de la prolifération, de la croissance et de la survie cellulaire [341].

L'obésité et le syndrome métabolique

L'OMS définit l'obésité comme une accumulation anormale de graisse corporelle pouvant nuire à la santé de l'individu. Le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC²) est un bon indicateur de l'obésité. Le surpoids est défini pour un IMC supérieur à 25 et l'obésité pour un IMC supérieur à 30. L'accumulation de

² $IMC = \frac{\text{masse (kg)}}{\text{taille (m)}}^2$

graisses provient d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense calorique. En 2008, l'OMS estimait que 1,4 milliards de personnes étaient en surpoids et 500 millions souffraient d'obésité, dont 40 millions d'enfants. L'obésité et le surpoids sont responsables de près de 3 millions de décès par an. L'obésité est une *pandémie* récente, liée à des facteurs génétiques, comportementaux et environnementaux.

L'excédant énergétique alimentaire est rapidement stockée sous forme de triacylglycérols dans les adipocytes. Chez les personnes obèses, le tissu adipeux présente une augmentation de la taille et du nombre d'adipocytes [342]. Le tissu adipeux sécrète de nombreux facteurs solubles (adipokines). Par exemple, La protéine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) permet le recrutement des cellules de l'inflammation. Ainsi, le tissu adipeux des personnes obèses présente une infiltration de macrophages et de lymphocytes T CD8⁺. Les macrophages, activés par la fixation d'acides gras libres sur le récepteur TLR-4, vont sécréter la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) [343]. Le TNF- α active la lipolyse dans les adipocytes permettant d'augmenter la production d'acides gras libres. Ainsi, se met en place une boucle d'auto-amplification à l'origine d'un état inflammatoire chronique.

Le tissu adipeux sécrète aussi des hormones insulino-sensibilisantes comme l'adiponectine [344] ou la leptine. La leptine contrôle la prise alimentaire en créant la sensation de satiété [345]. Chez les personnes obèses, ces deux hormones sont moins exprimées. Inversement, les hormones induisant une désensibilisation à l'insuline sont surexprimées (resistine par exemple).

L'inflammation chronique, le dépôt ectopique d'acides gras (lipotoxicité) et le dérégulation de la production des adipokines sont corrélés au développement d'une résistance à l'insuline [343], [346] caractérisée par une moindre réponse des cellules à l'insuline. L'insuline est sécrétée par le pancréas en réponse à une augmentation post-prandiale de la glycémie. L'insuline régule le stockage du glucose par le foie et les muscles et régule le stockage des lipides en inhibant la lipolyse (inhibition des lipases cellulaires) et en activant la lipogenèse dans les adipocytes. La moindre réponse des cellules hépatiques et musculaires à l'insuline provoque une hyperglycémie causant une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas. L'hyperinsulinémie agit au niveau des adipocytes en augmentant la lipogenèse et donc le stockage des lipides [347].

La résistance à l'insuline causée par la surcharge pondérale est un facteur de risque majeur du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique est défini par la présence simultanée d'au moins trois des problèmes suivants :

- surcharge pondérale mesurée par le périmètre abdominal (> 1 m),
- hyperglycémie ($>1,1$ g/L à jeun) associée à une hyperinsulinémie,
- hypertriglycéridémie,
- hypocholestérolémie HDL (« bon » cholestérol) et hypercholestérolémie LDL,
- hypertension artérielle.

D'autres facteurs sont souvent associés (mais non requis pour la définition du syndrome métabolique) tels qu'une microalbuminurie (présence d'albumine dans les urines), un état inflammatoire chronique ou un syndrome d'apnée obstructive du sommeil.

Le syndrome métabolique n'est pas une maladie déclarée mais un état métabolique anormal pouvant conduire au diabète de type 2 (non insulino-dépendant), à des complications cardiovasculaires et à des accidents vasculaires cérébraux. Le syndrome métabolique pourrait aussi être corrélé au déclin cognitif, à la démence, à la dépression, voir avec certains cancers (les composants du syndrome métabolique sont individuellement corrélés au développement d'un cancer colorectal [348])

4 Méthodologies

4.1 Culture cellulaire

Les cellules HeLa et Cos7 sont maintenues en culture dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose, 4 mM de L-glutamine, 1 mM pyruvate de sodium (PAA - GE Healthcare) et 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Invitrogen) à 37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide. Les cellules RPE-1 (retinal pigment epithelial) sont maintenues en culture dans du DMEM / Ham' F12 (1:1) (PAA) contenant 10% de FBS à 37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide.

Les cellules sont transfectées à environ 80% de confluence en utilisant de la lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou du FuGENE-6 (Roche) selon les instructions des fabricants. Pour l'induction des gouttelettes lipidiques, les cellules ont été traitées à l'acide oléique (OA) complexé à l'albumine sérique bovine (BSA) préparé comme décrit précédemment [51]. En bref, l'albumine sans acide gras (Sigma-Aldrich) a été dissoute dans 1 M de Tris-HCl pH 8,0 à une concentration finale de 2,1 mM, puis l'acide oléique (Sigma-Aldrich) a été ajouté à une concentration finale de 10 mM. Les cellules sont traitées avec 100-400 µM OA pendant 16-20h à 37°C. Pour le traitement à la bréfeldine A (BFA, Sigma-Aldrich), les cellules ont été traitées avec 5-10 µg/mL de BFA dans le milieu de culture pendant 5-10 minutes à 37°C.

4.2 Fractionnement

Le fractionnement subcellulaire permet de séparer par ultracentrifugation le cytosol (fraction soluble du cytoplasme) des membranes internes (non solubles) qui précipitent [349], [350]. Pour cela, environ 1,5x10⁶ cellules transitoirement transfectées sont incubées avec 10 µg/ml de BFA pendant 10 minutes à 37°C, rincées au PBS glacé, grattées, et récupérées par centrifugation à 1500 g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots cellulaires sont repris dans 200 µL de tampon d'homogénéisation (50 mM HEPES-KOH pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, contenant un inhibiteur de protéases (GE Healthcare)) par 5 passages à travers d'une aiguille de calibre G26 sur glace et lysées par 5 passages à travers une aiguille de calibre G30 sur glace. Les lysats cellulaires sont ensuite clarifiés par centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes à 4°C, et 100 µL du surnageant est centrifugé à 100 000 g pendant 50 minutes à 4°C dans un rotor libre Beckman (TLS-55). Deux fractions contenant le cytosol (surnageant) et les membranes (culot) ont été recueillies. La fraction membranaire a été remise en suspension dans 50 µL de tampon d'homogénéisation contenant 1% Triton X-100, 1% NP40 et 0,1% SDS. Un même volume des deux fractions a ensuite été analysé par SDS-PAGE, transféré sur des membranes de nitrocellulose révélées avec un anticorps contre la GFP. Les images ont été acquises à l'aide d'un FUJI LAS-3000 et la quantification d'au moins

trois expériences indépendantes a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ (NIH). Le pourcentage de protéine liée à la membrane est calculé de la façon suivante:

$$\%membrane = \frac{[M]}{[M] + 2[C]}$$

avec : [M] densité de la bande correspondant à la fraction membranaire,

[C] densité de la bande correspondant à la fraction cytosolique.

4.3 Micropattern

La technique du micropatterning permet de réduire la grande variabilité des phénotypes observés par microscopie classique. Pour cela, les cellules sont contraintes sur une forme géométrique simple (le micropattern). La position relative de chaque compartiment interne est alors figée et reproductible entre les cellules [351], [352]. Brièvement, un polymère de polylysine greffé de polyéthylène glycol (*poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)* co-polymère (PLL-*g*-PEG)) est adsorbé sur une lamelle en verre. Sous l'action des UV à 180 nm, la liaison éther oxyde (C-O-C) hydrophobe du PEG est oxydé en acide carboxylique (C-OOH) polaire [353].

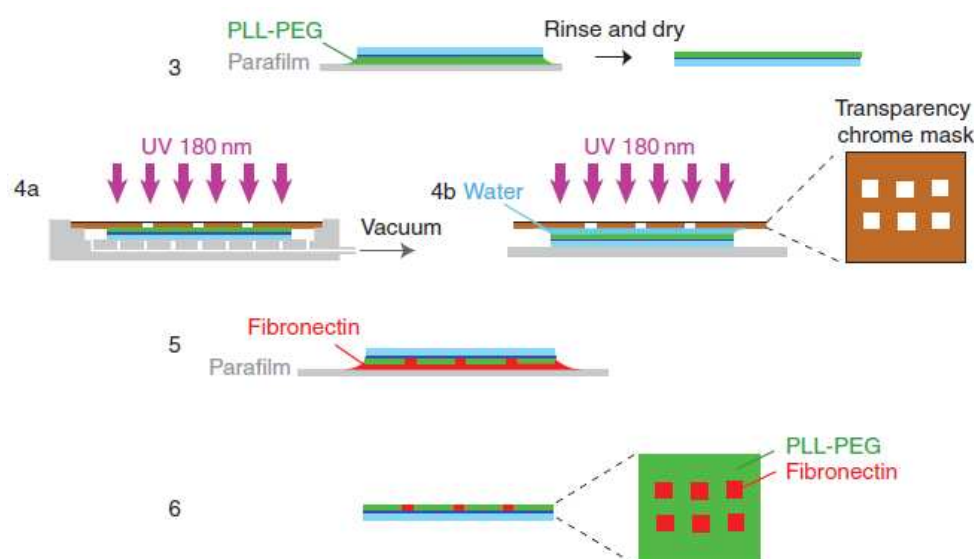


Figure 4-1 : Principe de la méthode d'obtention des micropatterns [354]. La lamelle en verre (trait bleu) est incubée dans du PLL-*g*-PEG (3) puis irradiée au travers d'un masque de chrome (4) pour obtenir l'empreinte des micropatterns. La lamelle est ensuite incubée dans la fibronectine (5) qui ne s'adsorbe que dans les zones illuminées pour former les micropatterns sur lesquels vont s'attacher les cellules (6).

Pour cela, les lamelles de verres sont rincées à l'éthanol, séchées puis stérilisées par illumination aux UV à 180 nm pendant 5 min. Les lamelles propres et stériles sont incubées 1h à température ambiante dans 15 µL de 0,1 mg/mL PLL(20)-*g*[3,5]-PEG(2) (SuSoS), 10 mM HEPES pH 7,3 puis séchées avant d'être fixées avec 3 µL d'eau au photomasque de chrome préalablement nettoyé et illuminé aux UV à 180 nm pendant 5 min. L'ensemble est ensuite illuminé pendant 6 min aux UV à 180 nm. Les lamelles ainsi photoimprimées sont incubées pendant 1h à température ambiante dans 50 µg/mL fibronectine (PAA), 5 µg/mL

fibrinogene-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) dans 100 mM NaHCO₃ pH 8,5 puis rincées au PBS stérile.

Les cellules sont ensuite placées sur la lamelle et laissées adhérer pendant 2h à 37°C avant d'être fixées et marquées par immunofluorescence. Les piles d'images sont ensuite acquises sur un vidéomicroscope à champ large (Zeiss) (objectif à immersion à l'huile Plan-Apo 63X/NA1,4 (420782-9900) puis déconvoluées (logiciel Huygens, ImagoSeine) avant d'être analysées en utilisant le logiciel Image J (NIH). Les cellules sont alignées et centrées en utilisant l'image du micropattern puis le signal dans le canal bleu (noyaux marqués au DAPI), vert (micropattern marqué par l'Alexa Fluor 488), et rouge (signal à analyser) est moyenné à partir d'une dizaine de cellules pour engendrer l'image d'une cellule de référence représentant la localisation moyenne du signal.

4.4 Microscopie

4.4.1 Immunofluorescence

Pour la microscopie photonique, les cellules HeLa ont été cultivées sur des lamelles de verre (épaisseur 0,17 mm) et fixées avec du formaldéhyde à 4% (Sigma-Aldrich) à température ambiante pendant 15 minutes. Les cellules ont été incubées pendant 40 minutes à 1 heure dans un tampon de blocage (20 mM de glycine, 0,3% de BSA, 0,01% de saponine (Sigma-Aldrich) dans du PBS) à température ambiante, et incubés avec l'anticorps primaire pendant 16 heures (une nuit) à 4°C, puis avec un anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante. Pour marquer les gouttelettes lipidiques, les cellules ont été incubées avec 1 µg/mL de BODIPY 493/503 (Invitrogen) dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Les lamelles ont été montées sur des lames de verre dans du Prolonge Antifade Gold (Invitrogen), puis scellé au vernis à ongles et conservés à 4°C. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal inversé à balayage laser (TCS SP5 AOBS Tandem scanner résonant, Leica) avec un objectif apochromatique (APO HCX 63x/1.4 huile λ Bl (506 192)). Les images ont été traitées et analysées en utilisant le logiciel ImageJ (NIH). Le pourcentage de signal dans la région du Golgi a été déterminé de la façon suivante:

$$\%_{Golgi} = \frac{I_{Golgi} - (Moy_{bruit} \times A_{Golgi})}{I_{image} - (Moy_{bruit} \times A_{image})}$$

avec : I_{Golgi} l'intensité du signal à l'intérieur de la région du Golgi automatiquement segmentés avec le signal GM130,

Moy_{bruit} le signal moyen du bruit mesuré dans une région en dehors de la cellule,

A_{Golgi} l'aire de la région du Golgi,

I_{image} l'intensité de l'image entière,

A_{image} l'aire de l'image.

4.4.2 FRAP

Les analyses de dynamique sont effectuées par mesure du temps de recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP, fluorescence recovery after photobleaching) comme décrit précédemment [355], [356].

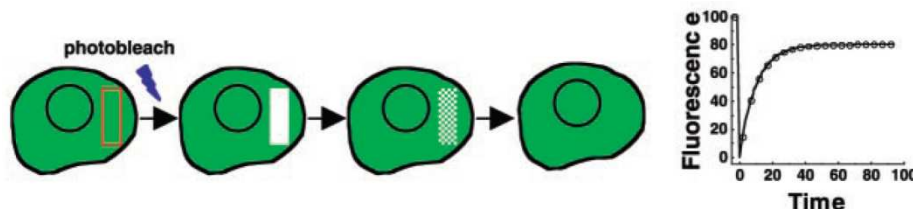


Figure 4-2 : Principe de la technique FRAP [357]. Une région d'intérêt (ROI, cadre rouge) est photoblanchie par un laser à forte intensité. Le retour de la fluorescence dans la ROI mesuré en fonction du temps est un indicateur de la mobilité de la protéine étudiée.

Les cellules maintenues en culture sur une lamelle de verre sont transitoirement transfectées par une protéine fluorescente (4.1 ci-dessus). Les mesures de FRAP sont réalisées sur cellules vivantes à 37°C dans un milieu sans rouge de phénol contenant 20 mM HEPES pH 8 sur un microscope confocal à balayage laser (TCS SP5 AOBS Tandem scanner résonant, Leica) (objectif APO HCX 63x/1.4 huile λ Bl (506 192)). Trois images de la cellule avant photoblanchiment sont prises à faible intensité du laser (environ 2%). Ensuite, la région d'intérêt (ROI) correspondant à une seule gouttelette lipidique isolée est scannée 3 fois avec le laser à la puissance maximale (100%) pour photoblanchir la fluorescence aussi complètement que possible. La récupération de la fluorescence dans la ROI est suivie immédiatement par imagerie à faible intensité du laser pendant 5 min à 7 min. Les images sont été traitées et analysées en utilisant le logiciel ImageJ (NIH) [356] :

$$I(t) = \frac{I_{ROI}(t)}{I_{ROI}(t_0)} \times \frac{I_{cell}(t_0)}{I_{cell}(t)} \times 100$$

avec : $I_{cell}(t_0)$ l'intensité moyenne de la cellule avant photoblanchiment,

$I_{cell}(t)$ l'intensité de la cellule à l'instant t ,

$I_{ROI}(t_0)$ l'intensité moyenne dans la ROI avant photoblanchiment,

$I_{ROI}(t)$ l'intensité dans la ROI à l'instant t .

4.5 Quantification autour des gouttelettes lipidiques

Des algorithmes de traitement d'images ont été développées en collaboration avec Vincent Contremoulins (ImagoSeine, Institut Jacques Monod) pour quantifier l'intensité du signal autour des gouttelettes lipidiques à l'aide des logiciels Imaris 7,6 (Bitplane) et ImageJ (NIH). Ces deux algorithmes permettent d'une part de segmenter les gouttelettes lipidiques pour en déterminer les coordonnées dans l'espace et d'autre part de mesurer l'intensité du signal en fonction de la distance aux gouttelettes dans toutes les directions de l'espace (Figure 4-3).

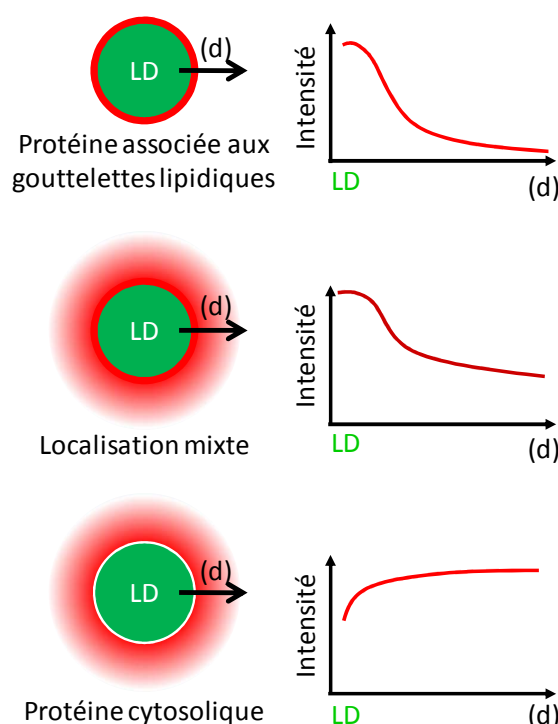


Figure 4-3 : Principe de quantification du signal autour des gouttelettes lipidiques. LD = gouttelette lipidique (Lipid droplet).

Toutes les images ont été traitées avec les mêmes paramètres. La taille et la position des gouttelettes lipidiques ont été établies avec l'outil de détection des points d'Imaris en utilisant l'option de croissance de zone sur l'image verte qui correspond au cœur des gouttelettes lipidiques marqués au Bodipy. L'image des positions des gouttelettes lipidiques isolées est ensuite générée et exportée vers ImageJ afin d'identifier les pixels qui sont à l'intérieur de la cellule et à l'extérieur des gouttelettes lipidiques dans le canal rouge. Ces pixels sont obtenus par une transformation de la distance euclidienne exacte en 3D effectuée à partir de l'image des positions des gouttelettes lipidiques isolées afin de créer une nouvelle image où les valeurs des intensités des pixels sont égales à la distance aux gouttelettes lipidiques précédemment obtenues. Des seuils successifs de cette carte de distance ont été réalisés dans le but de créer un masque pour chaque distance aux gouttelettes lipidiques. Ces masques ont été utilisés pour sélectionner les pixels qui ont été quantifiés dans le canal rouge. Un autre masque correspondant à la frontière de la cellule a été obtenu par filtration (filtre médian) et seuillage avec un niveau bas dans le canal rouge. Enfin, la moyenne du signal dans le canal rouge des pixels inclus dans le masque de la cellule a été calculée pour chaque distance aux gouttelettes lipidiques. La moyenne du signal a été normalisée par rapport à la valeur maximale et représentée en fonction de la distance aux gouttelettes lipidiques pour générer un profil d'intensité du signal du canal rouge le long de la section transversale des gouttelettes lipidiques (vecteur (d) Figure 4-3)

4.6 Plasmides

Tableau 4-1 : Liste des plasmides utilisés

Plasmide	Protéine exprimée	Réf. *
pEGFP-C1	eGFP	Clontech
pEGFP-GBF1	GFP-GBF1	[358]
pEGFP-GBF1 Δ HDS1	GFP-GBF1 with the 887-1066 deletion	
pEGFP-GBF1 Δ HDS2	GFP-GBF1 with the 1068-1278 deletion	
pEGFP-GBF1 Δ HDS1-2	GFP-GBF1 with the 887-1278 deletion	
pEGFP-GBF1 Δ AH	GFP-GBF1 with the 1021-1041 deletion	
pEGFP-H5-GBF1	GFP-GBF1(1021-1048)	
pEGFP-H4-5-GBF1	GFP-GBF1(1005-1048)	
pEGFP-Sec7-HDS1-GBF1	GFP-GBF1(710-1066)	
pEGFP-Rab1B+8	GFP-Rab1B Δ CC-kras4B(171-188)	
pEGFP-Rab1B(Q67L)+8	GFP-Rab1B Δ CC-kras4B(171-188) with the Q67L mutation	
pEGFP-Rab1B(N121I)+8	GFP-Rab1B Δ CC-kras4B(171-188) with the N121I mutation	
pEYFP-C1	eYFP	Clontech
pEYFP-Sec7-GBF1	YFP-GBF1(710-894)	[355]
pm-Cherry-C1	mCherry	Clontech
pmCherry-HDS1	mCherry-GBF1(911-1066)	
pmCherry-HDS1-I1023K	mCherry-GBF1(911-1066) with the I1023K mutation	
pmCherry-HDS1-L1024A	mCherry-GBF1(911-1066) with the L1024A mutation	
pmCherry-HDS1-R1025S	mCherry-GBF1(911-1066) with the R1025S mutation	
pmCherry-HDS1-W1028S	mCherry-GBF1(911-1066) with the W1028S mutation	
pmCherry-HDS1-I1031A	mCherry-GBF1(911-1066) with the I1031A mutation	
pmCherry-HDS1-L1038A	mCherry-GBF1(911-1066) with the L1038A mutation	
pmCherry-HDS1-R1040S	mCherry-GBF1(911-1066) with the R1040S mutation	
pmCherry-HDS1-R1025S-W1028S	mCherry-GBF1(911-1066) with the R1025S and W1028S mutations	
pmCherry-HDS1-W1028S-K1029S	mCherry-GBF1(911-1066) with the W1028S and K1029S mutations	
pmCherry-HDS1-AAA	mCherry-GBF1(911-1066) with the L1024A, I1031A and L1038A mutations	
pmCherry-H5-GBF1	mCherry-GBF1(1021-1048)	
pmCherry-H4-5-GBF1	mCherry-GBF1(1005-1048)	
pmCherry-Sec7-HDS1	mCherry-GBF1(710-1066)	
pVenus-C1	Venus: YFP with mutations F46L, F64L, M153T, V163A, S175G	G. Patterson
pTKN101	Venus-GBF1	[47]
pVenus-HDS1	Venus-GBF1(900-1067)	[46]
pVenus-HDS2	Venus-GBF1(1067-1278)	[46]
pVenus-GBF1-W1028S	Venus-GBF1 with the W1028S mutation	
pVenus-GBF1-W1028S-R1025S	Venus-GBF1 with the W1028S and R1025S mutations	
pVenus-GBF1-W1028S-K1029S	Venus-GBF1 with the W1028S and K1029S mutations	
pVenus-NGBF1	Venus-GBF1(1-900)	[47]
pVenus- Δ Bgl	Venus-GBF1(1-1060)	
pVenus-3820	Venus-GBF1(1-1273)	[47]
pVenus-4320	Venus-GBF1(1-1440)	[47]
pVenus-5010	Venus-GBF1(1-1670)	
pVenus- Δ Sec7	Venus-GBF1 with the 710-900 deletion	
pVenus-265	Venus-GBF1(89-1856)	
pVenus-900	Venus-GBF1(300-1856)	
pVenus-1500	Venus-GBF1(500-1856)	
pVenus-CGBF1	Venus-GBF1(710-1856)	
pVenus-HUStoHDS2	Venus-GBF1(211-1278)	

* NB : les plasmides dont la référence n'est pas indiquée ont été clonés pendant le doctorat.

5 Mise en évidence d'un domaine de liaison aux lipides

5.1 Localisation et dynamique de GBF1

5.1.1 GBF1 est localisée sur le cis-Golgi

Dans un premier temps, nous avons souhaité préciser et confirmer la localisation de GBF1 endogène dans les cellules RPE. Ces cellules ne sont pas transformées et ont la capacité de s'étaler largement sur le support qui leur est fourni. De fait, les cellules sont très plates (quelques micromètres d'épaisseur) ce qui induit une bonne séparation des compartiments internes (Figure 5-1).

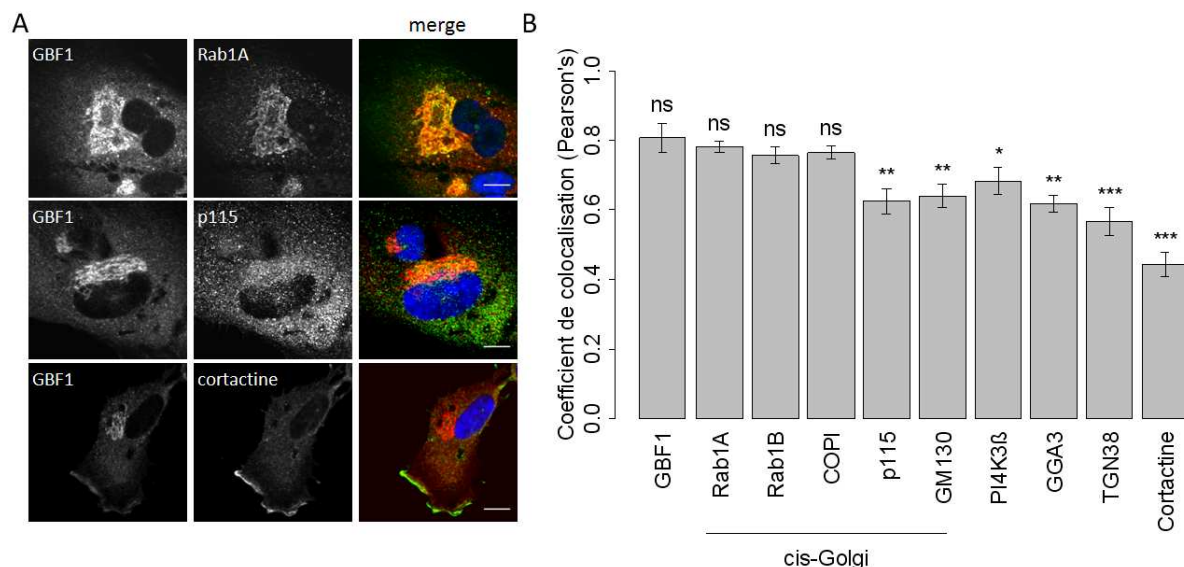


Figure 5-1 : GBF1 est localisé sur les membranes de la voie sécrétoire précoce. (A) Images confocales de cellules RPE-1 montrant la colocalisation de GBF1 endogène avec les marqueurs du cis-Golgi (Rab1A, p115) ou de la membrane plasmique (cortactine). Barre d'échelle = 10µm ; (B) Quantification de la colocalisation de GBF1 endogène avec les marqueurs indiqués (Plugin Image J). La première colonne correspond au marquage de GBF1 avec deux anticorps différents (rat et souris). * p-value<0,01 ; ** p-value<0,001 ; ***p-value<10⁻³ (Test de Student par rapport à GBF1).

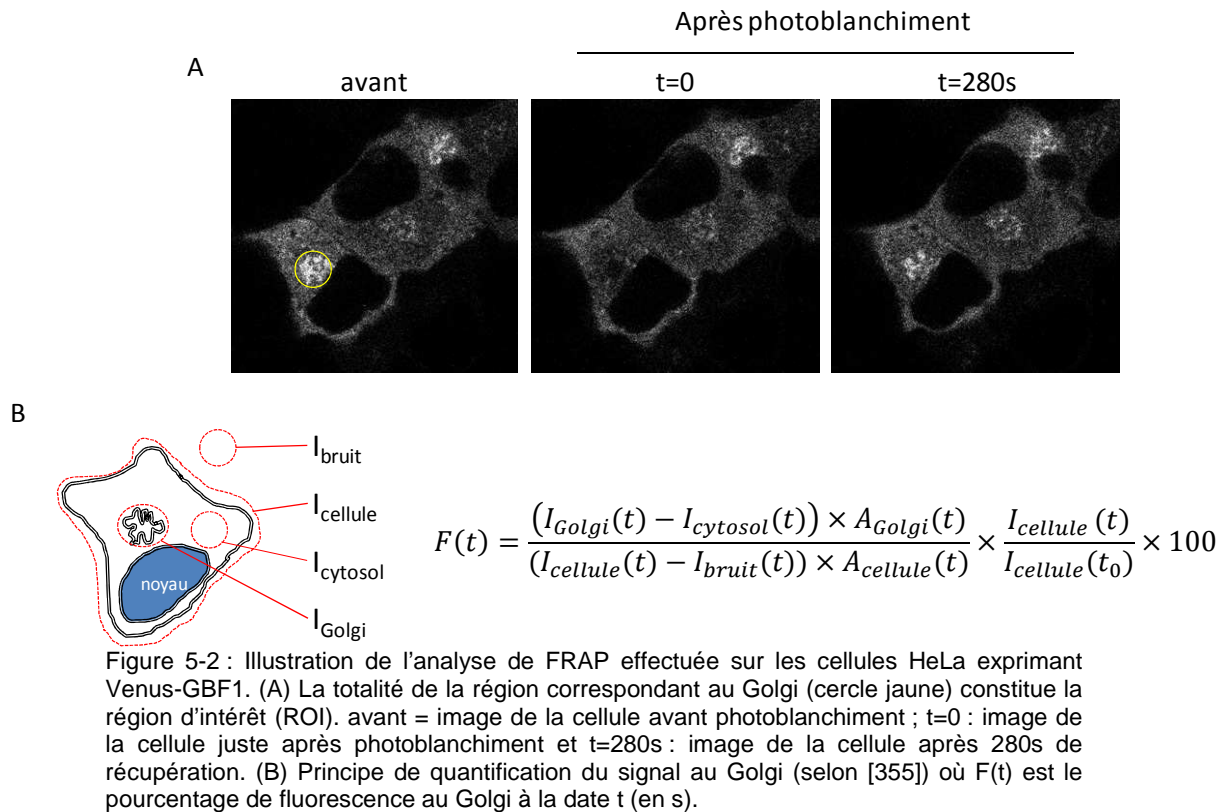
Nous avons étudié la colocalisation de GBF1 endogène avec quelques marqueurs de la voie sécrétoire précoce (Figure 5-1). GBF1 colocalise avec Rab1A et Rab1B ainsi qu'avec le manteau COPI. GBF1 montre une association moins forte sur les structures cytoplasmique p115. Ces résultats indiquent que GBF1 est

localisée au niveau du *cis*-Golgi et sur des structures ponctuelles dispersées dans le cytoplasme qui seraient des éléments du ERGIC.

GBF1 est aussi reporté pour être localisé autour des gouttelettes lipidiques [51]. Cette localisation est observée dans les cellules HeLa après une carence des cellules en acide gras suivie une induction des gouttelettes lipidiques à l'acide oléique. Dans un modèle d'adipocytes induits *in vitro*, GBF1 est localisé autour des gouttelettes lipidiques, avec ou sans induction de la lipolyse (Krishnakant G. Soni, NIH, *non publié*).

5.1.2 GBF1 est une protéine périphérique dynamique

GBF1 est une protéine périphérique transitoirement associée aux membranes. Son expression est finement régulée et une surexpression ou une déplétion a des effets délétères empêchant la survie de la cellule sur le long terme. Afin d'observer la dynamique de GBF1, nous avons exprimé transitoirement en cellule HeLa Venus-GBF1 [355] (Figure 5-2). La totalité de la région du Golgi est photoblanchie et le pourcentage de fluorescence au Golgi est calculé comme indiqué sur la Figure 5-2.



L'analyse des données de FRAP sur 37 cellules issues de 2 transfections indépendantes montre que la fluorescence est rapidement restaurée sur le Golgi ($t_{1/2} = 15$ s) (Figure 5-3). Le recouvrement de la fluorescence n'est pas total, suggérant qu'une fraction de GBF1 est immobilisée en dehors du Golgi. Cependant, la quantité de signal dans le cytosol est proportionnelle au taux d'expression du transgène. C'est-à-dire que plus le taux d'expression est fort, plus le signal dans le cytosol est important. Or le signal dans le cytosol de GBF1 endogène est assez

faible. Nous avons donc choisi des cellules exprimant faiblement le transgène pour les expériences de FRAP. La quantité de signal détruit lors du photoblanchiment est d'environ 25% du signal total. Cela explique que le recouvrement de fluorescence ne peut pas revenir à 100% du signal avant le photoblanchiment. Nous pouvons donc estimer que le recouvrement de fluorescence au Golgi est total, ce qui nous indique que GBF1 cycle rapidement entre sa forme liée aux membranes et la forme cytosolique.

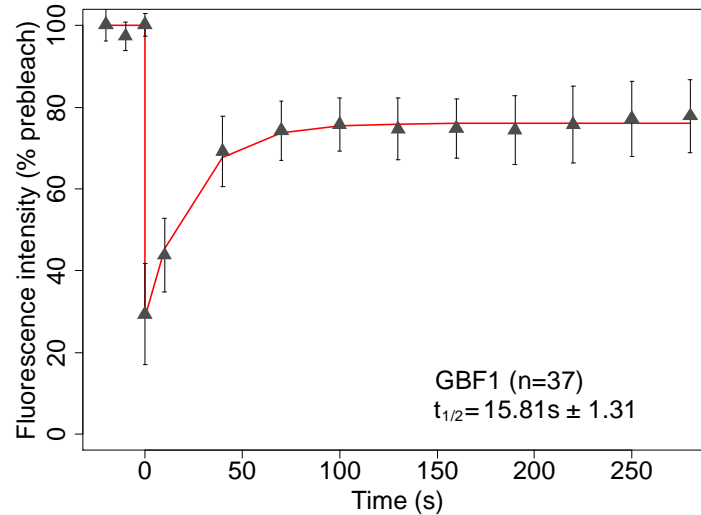


Figure 5-3 : Dynamique de GBF1 au Golgi. La dynamique de GBF1 est analysée par FRAP dans des cellules HeLa transitoirement transfectées avec Venus-GBF1 comme illustré dans la Figure 5-2. Les images de 37 cellules issues de 2 transfections indépendantes sont analysées comme décrit. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95%. Le $t_{1/2}$ est déterminé sous R grâce à l'estimation des paramètres du modèle $F(t) = a + b(1 - e^{-ct})$ et $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{c}$.

Ce résultat est semblable aux observations de notre équipe déjà publiées dans les cellules NRK [355]. Cela suggère que la dynamique de GBF1 est indépendante des cellules utilisées et est un processus commun à toutes les cellules (ubiquitaire).

5.1.3 GBF1 possède deux régions de localisation

Nous avons voulu déterminer la (les) région(s) importante(s) pour la localisation de GBF1 sur les membranes de la voie sécrétoire précoce. Pour cela des troncations successives de l'extrémité N-terminal ou C-terminale ont été générées puis transfectées dans des cellules de mammifère *in vitro*. Les cellules vivantes ont été observées en vidéomicroscopie et les résultats sont synthétisés dans la Figure 5-4. L'ajout de BFA permet de stabiliser l'association de GBF1 aux membranes en bloquant un complexe inactif entre GBF1 et Arf1(GDP) [40] permettant de mesurer la capacité de GBF1 à fixer les membranes. Tous les mutants étudiés possèdent le domaine Sec7 sauvage et sont donc *a priori* sensibles à la BFA.

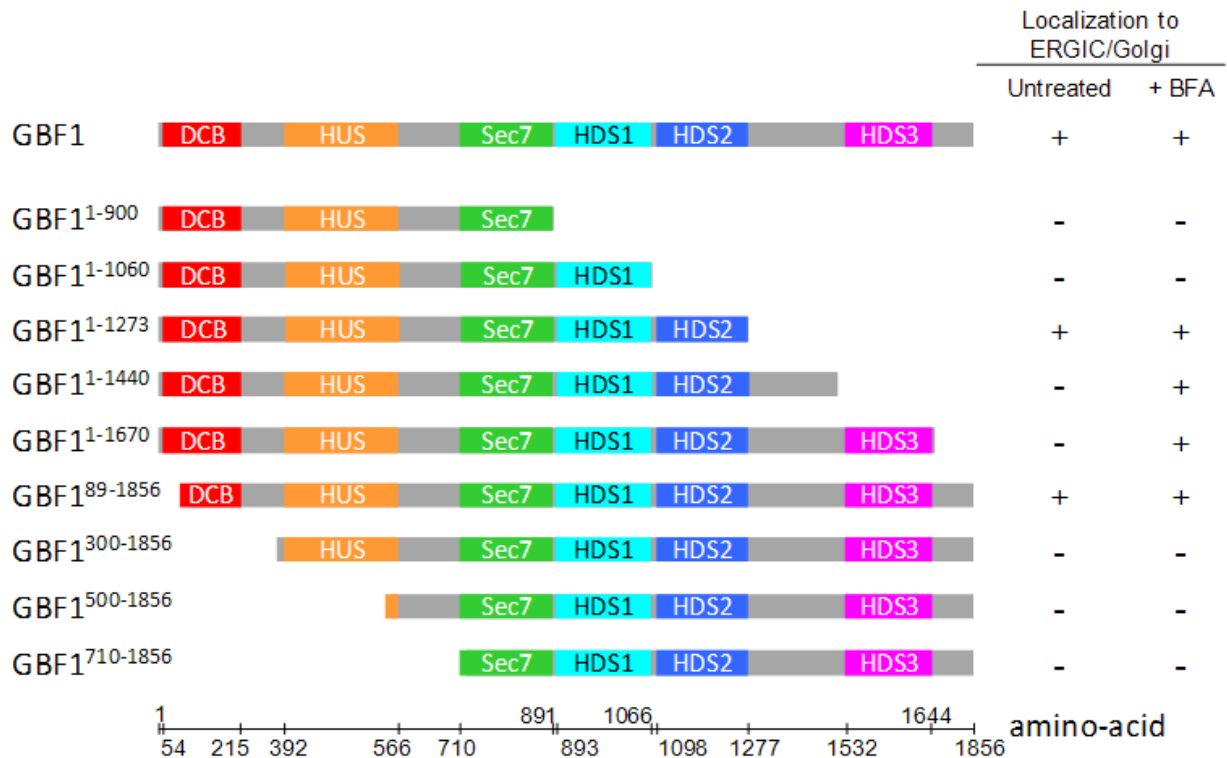


Figure 5-4 : Etude de la localisation des mutants de délétion du C-terminal ou du N-terminal de GBF1. Les cellules (RPE-1 ou Cos7) exprimant transitoirement les constructions indiquées de GBF1 en fusion avec Venus sont observées par vidéomicroscopie avec (+BFA) ou sans (Untreated) traitement à la BFA. La localisation ERGIC/Golgi est définie comme une accumulation du signal sur des structures ponctuelles et/ou regroupées dans une région périnucléaire. Cette localisation est ensuite confirmée par coexpression avec CFP-p58, marqueur du ERGIC.

La perte de l'extrémité N-terminale (domaine DCB) induit une perte de la localisation de GBF1 sur les membranes de la voie sécrétoire précoce (mutant GBF1³⁰⁰⁻¹⁸⁵⁶). De même, la perte des domaines HDS1 et HDS2 induit une perte de la localisation de GBF1. Ces résultats montrent que les domaines DCB, HDS1 et HDS2 sont nécessaires pour la localisation de GBF1 sur les membranes du ERGIC et du Golgi. La perte de localisation membranaire de GBF1 en absence des domaines C-terminaux a été confirmée par fractionnement subcellulaire des cellules HeLa exprimant les différentes versions de GBF1 (Figure 5-5). Seul le mutant GBF1¹⁻⁹⁰⁰ (délétion des domaines en aval du domaine Sec7) montre une diminution de la capacité à lier les membranes.

Le domaine DCB est impliqué dans la dimérisation de GBF1 [45] et dans l'interaction avec Rab1 (6.2.1 ci-dessous) [48]. Inversement, la fonction des domaines HDS1 et HDS2 n'est pas connue. Nous décidons donc, par la suite, de nous intéresser aux domaines HDS1 et HDS2.

Pour cela, nous avons construit des mutants de délétion des domaines HDS1 ou HDS2 de GBF1. Ces mutants fusionnés à la GFP sont ensuite exprimés dans des cellules HeLa fixées et observées en microscopie confocale. Afin de déterminer la localisation des différents mutants de GBF1 sur les membranes de la voie sécrétoire précoce, le *cis*-Golgi a été marqué par GM130 (facteur d'attachement spécifique du *cis*-Golgi) (Figure 5-6). Nous pouvons observer que l'élimination des domaines HDS1 et/ou HDS2 induit une perte de la localisation de GBF1 dans la

région périnucléaire correspondant au Golgi. Ainsi, nous n'observons pas de colocalisation entre les deux marqueurs, contrairement à GBF1 sauvage.

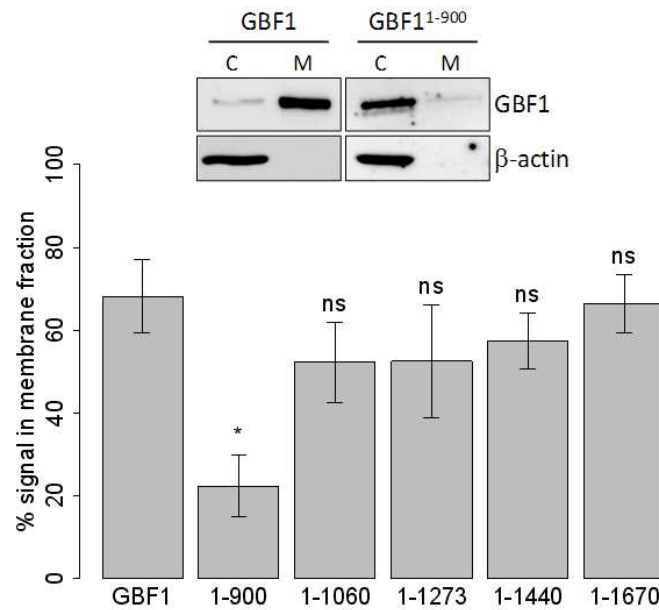


Figure 5-5 : Fractionnement subcellulaire de cellules HeLa exprimant GFP-GBF1 ou les différents mutants présentés sur la Figure 5-4. Image de western blot représentative de trois transfections indépendantes. C= fraction cytosolique et M= fraction membranaire ; Quantification de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type. * p-value<0,0001 ; ns= p-value> 0,01

L'absence de colocalisation sur cellules fixées peut s'expliquer par un recyclage plus rapide de GBF1 sur les membranes en absence des domaines HDS1 et HDS2. Pour tester cette hypothèse, nous traitons les cellules à la BFA afin de stabiliser et de bloquer les éventuelles interactions entre les membranes et les mutants de GBF1. Comme prévu, GBF1 sauvage est majoritairement localisée au niveau du Golgi après traitement à la BFA (Figure 5-6, panel de droite et Figure 5-7 A). Cependant, aucun des mutants de GBF1 ne montre de concentration dans la région périnucléaire après traitement à la BFA.

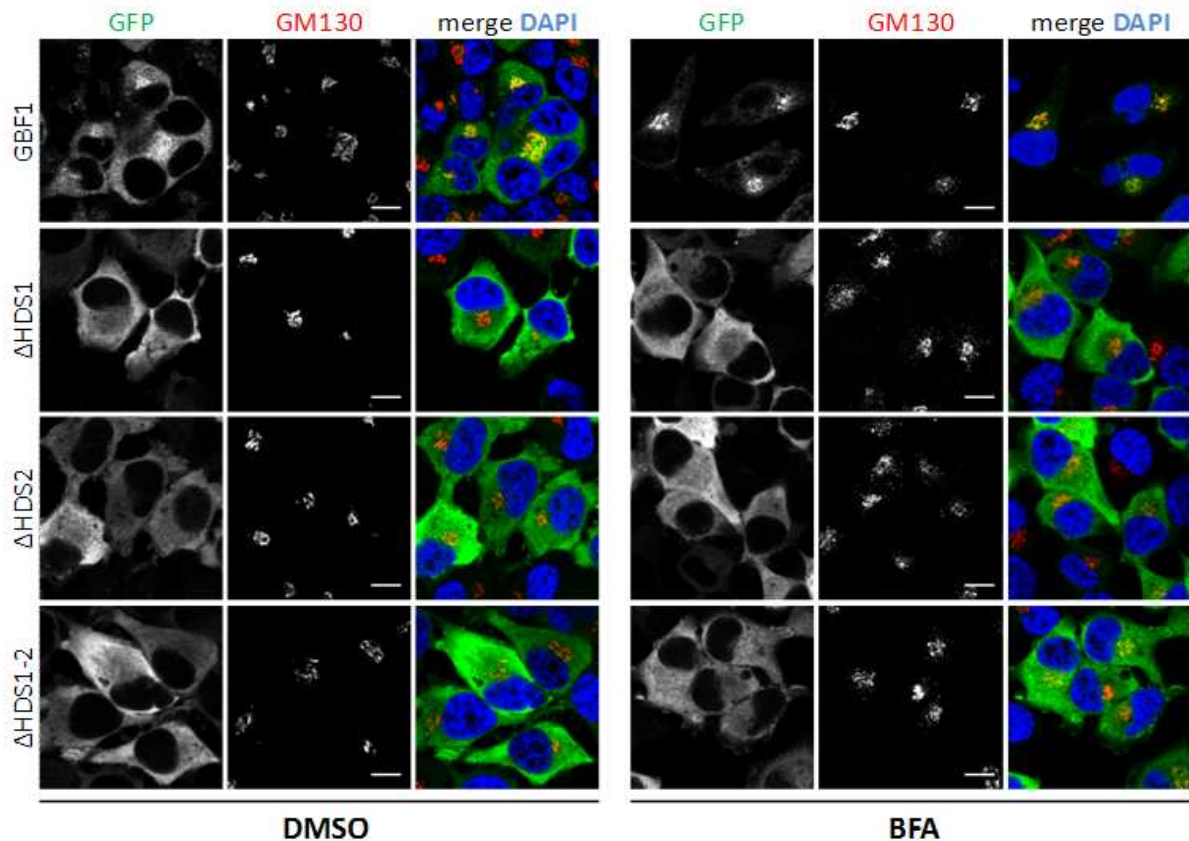


Figure 5-6 : Images confocales de la localisation de GBF1 et des mutants de délétion des domaines HDS. Les cellules HeLa transitoirement transfectées sont fixées et traitées pour visualiser le *cis*-Golgi (marquage GM130). Les images sont représentatives de trois transfections indépendantes. L'image *merge* est une superposition des deux images où GBF1 est visualisée en vert et le Golgi en rouge. La présence de pixels jaunes indique une colocalisation entre les deux marqueurs.

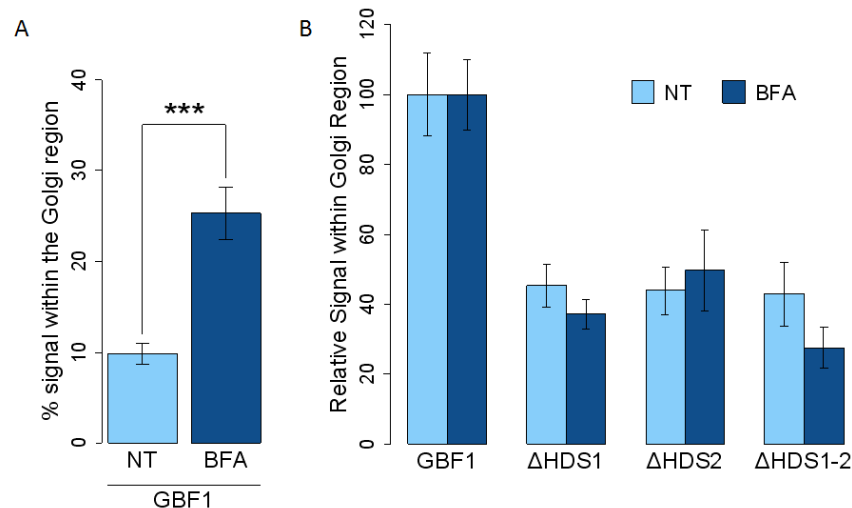


Figure 5-7 : Quantification de la localisation dans la région Golgienne des mutants de GBF1. (A) Effet de la BFA sur la localisation au Golgi de GBF1 sauvage. (B) Quantification des images issues de trois transfections réalisées comme indiquées dans la Figure 5-6. Les données sont normalisées par rapport à GBF1 sauvage. NT : cellules non traitées, BFA : cellules traitées avec 10 µg/mL BFA pendant 10 min avant traitement par immunofluorescence.

La localisation subcellulaire d'une protéine relève de la combinaison de plusieurs facteurs. Afin de tester l'hypothèse d'une moins forte association de

GBF1 sur les membranes cellulaires, nous avons réalisé une étude de fractionnement des différents mutants de GBF1 (Figure 5-8). Cette analyse montre une diminution de 50% de la quantité totale de GBF1 associée avec la fraction membranaire lors d'une délétion des domaines HDS1 et/ou HDS2.

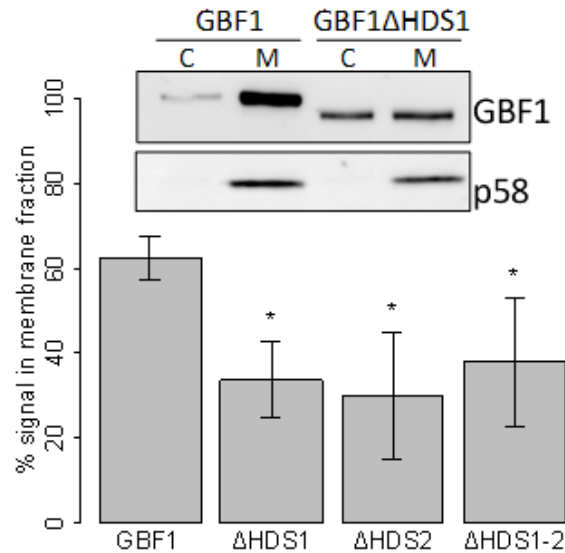


Figure 5-8 : Fractionnement subcellulaire de cellules HeLa exprimant GFP-GBF1 ou les différents mutants de délétion des domaines HDS1 et HDS2. Image de western blot représentative de trois transfections indépendantes. C= fraction cytosolique et M= fraction membranaire ; Quantification de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type. * p-value < 0,001 (Test de Student).

5.2 Le domaine HDS1 est un domaine de liaison aux lipides

5.2.1 Le domaine HDS1 est associé aux membranes des gouttelettes lipidiques

Les domaines HDS1 et HDS2 sont exclusivement localisés autour des gouttelettes lipidiques dans les cellules traitées à l'acide oléique [46] (Figure 5-9).

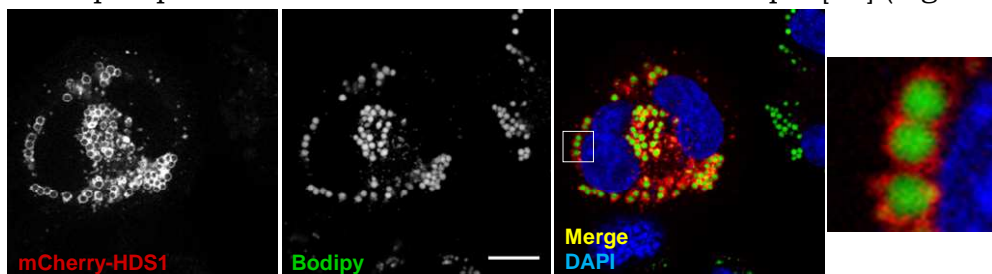


Figure 5-9 : Le domaine HDS1 est localisé autour des gouttelettes lipidiques. Cellules HeLa exprimant transitoirement mCherry-HDS1 et incubées avec 400 μM d'acide oléique pendant 16h. Le cœur des gouttelettes lipidiques est marqué au Bodipy 493/503. Les noyaux sont marqués au DAPI. (barre d'échelle 10 μm)

Nous avons voulu étudier la localisation du domaine dans les cellules sans traitement. L'expression du domaine HDS1 dans les cellules non traitées à l'acide

oléique montre une absence de localisation sur des structures discrètes mais plutôt un marquage cytoplasmique non homogène suggérant que le domaine n'est pas cytosolique. Des expériences de fractionnement montrent que ce domaine est exclusivement retrouvé dans la fraction membranaire (Figure 5-10). Nous avons donc voulu savoir quel était la membrane sur laquelle se fixait HDS1 dans les cellules non traitées à l'acide oléique.

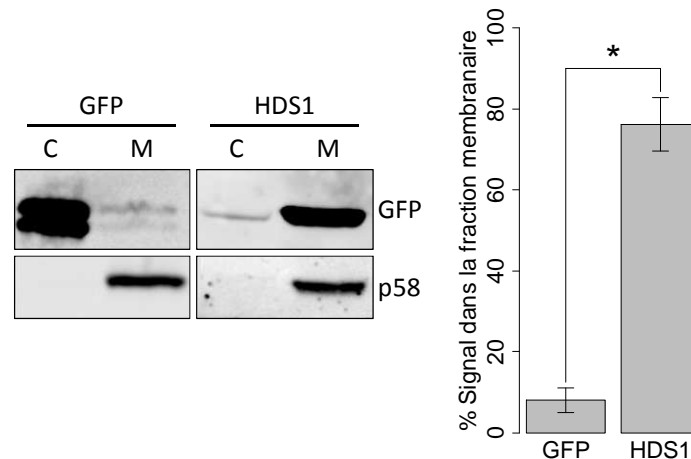


Figure 5-10 : Le domaine HDS1 est associé aux membranes en l'absence de traitement à l'acide oléique. Fractionnement de cellules HeLa exprimant transitoirement GFP ou Venus-HDS1. p58 (aussi appelée ERGIC53) est une protéine transmembranaire, marqueur de la fraction membranaire. C=fraction cytosolique. M=fraction membranaire. L'image de Western blot est représentative d'au moins 3 expériences indépendantes. Les blots ont été quantifiés en utilisant le logiciel Image J (NIH). * p-value < 10^{-4} (Test de Student).

L'observation de la localisation cellulaire du domaine HDS1 dans les cellules HeLa non traitées à l'acide oléique pourrait ressembler au réticulum endoplasmique déformé [359]. Nous avons coexprimé Venus-HDS1 avec des marqueurs de la voie sécrétoire précoce (Figure 5-11). HDS1 ne montre pas de colocalisation avec ERGIC53 / p58 (ERGIC) et p115 (*cis*-Golgi).

Cependant, le marqueur du réticulum endoplasmique KDEL-mRFP montre une colocalisation partielle avec le signal Venus-HDS1. A la résolution de la microscopie photonique, nous pouvons supposer que le domaine HDS1 est localisé sur des membranes proches du réticulum endoplasmique. En revanche, dans les cellules exprimant le domaine HDS1, le réticulum endoplasmique semble avoir une structure normale.

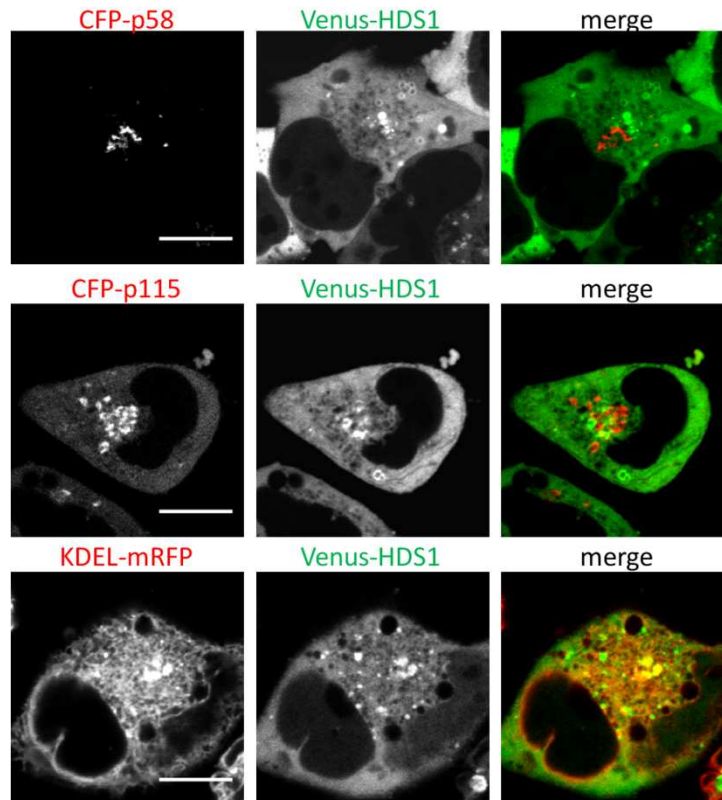


Figure 5-11 Images confocales de cellules HeLa vivantes, cotransfectées avec Venus-HDS1 et différents marqueurs de la voie sécrétoire précoce, non traitées à l'acide oléique. Barre d'échelle = 10 μ m

GBF1 est une protéine périphérique transitoirement associée aux membranes du *cis*-Golgi. Nous avons donc mesuré la dynamique du domaine HDS1 sur la monocouche des gouttelettes lipidiques, et comparé à la dynamique de GBF1 sur la bicouche du Golgi. Pour cela, j'ai photoblanchi le signal mCherry-HDS1 autour d'une gouttelette lipidique isolée puis enregistré le retour de la fluorescence pendant 5 min à 7 min (Figure 5-12). L'analyse de 55 événements de FRAP indépendants ne permet pas de montrer un retour de la fluorescence autour des gouttelettes lipidiques. Cela indique que le domaine HDS1 est stablement associé autour des gouttelettes lipidiques.

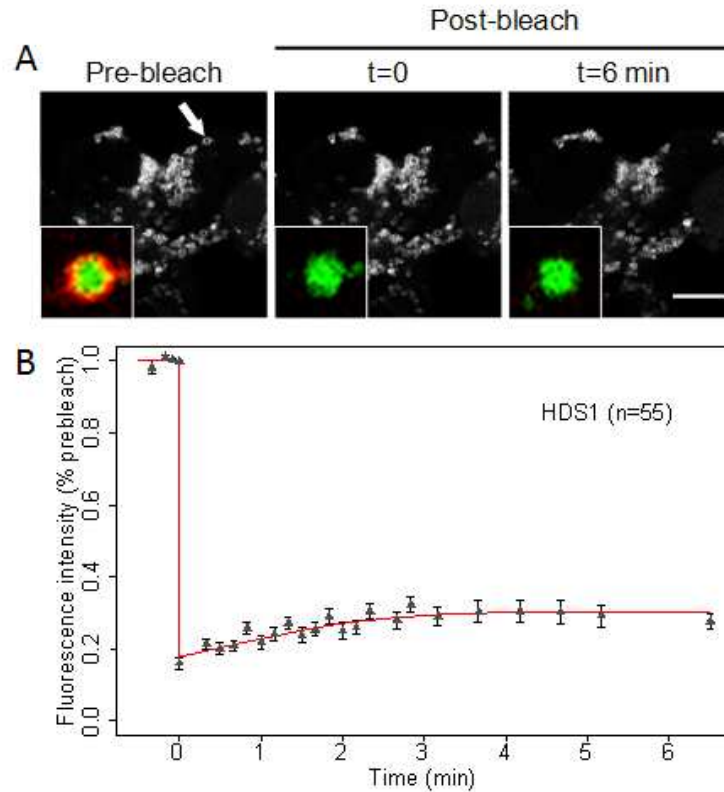


Figure 5-12 : Le domaine HDS1 est stablement associé aux gouttelettes lipidiques. (A) Analyse FRAP de cellules HeLa transitoirement transfectées avec mCherry-HDS1 et traitées à l'acide oléique. L'analyse porte sur une unique gouttelette lipidique isolée (indiquée par la flèche blanche). (B) Données normalisées et corrigées représentant 55 expériences de FRAP (cellules issues de 3 transfections indépendantes).

Nous avons souhaité quantifier la localisation du domaine HDS1 autour des gouttelettes lipidiques afin de mesurer l'effet des mutations. Notre approche a consisté à mesurer l'intensité de la fluorescence mCherry le long d'un vecteur tangent aux gouttelettes lipidiques (Figure 5-13). Cette approche a permis d'élaborer en collaboration avec la plateforme ImagoSeine, des algorithmes utilisant les logiciels Imaris et Image J (cf. 4.5 ci-dessus).

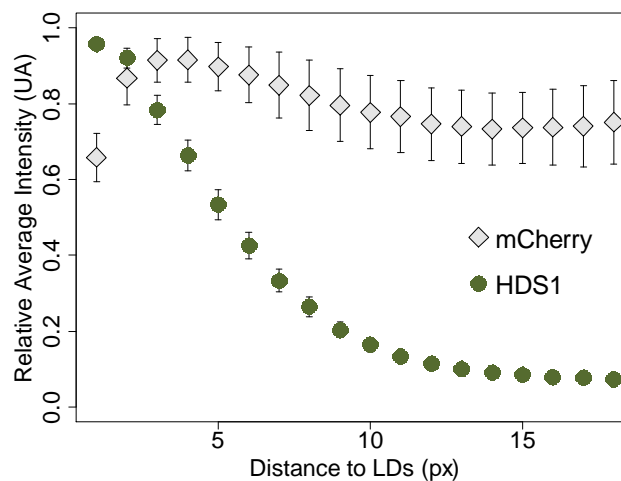


Figure 5-13 : Principe de la quantification du signal autour des gouttelettes lipidiques. Le signal mCherry est quantifié autour des gouttelettes lipidiques en utilisant la méthode décrite (4.5 ci-dessus). Comparaison entre une protéine cytosolique (mCherry) et une protéine associée aux gouttelettes lipidiques (HDS1).

Des expériences complémentaires de biochimie réalisées au laboratoire ont montré que le domaine HDS1 est capable de fixer directement des liposomes *in vitro* (Bouvet S., J Cell Sci. *in press*). Collectivement, ces résultats montrent que le domaine HDS1 est un domaine de liaison aux membranes capable *in cellulo* de cibler spécifiquement les gouttelettes lipidiques.

5.2.2 Une hélice amphipatique est nécessaire pour l'association du domaine HDS1 aux membranes

L'analyse bioinformatique du domaine HDS1 prédit que celui-ci est essentiellement composé d'hélices alpha [360]. En particulier, une hélice située en C-terminal du domaine formerait une hélice amphipatique (Figure 5-14). Cette hélice possède une face hydrophobe bien développée au sein de laquelle se trouve un tryptophane conservé. La face polaire comporte des acides aminés chargés négativement à l'interface (arginine et lysine) ainsi qu'un regroupement d'acides aminés hydrophiles au sommet de l'hélice et orientés vers le solvant (acide aspartique et acide glutamique). Ces propriétés en font un bon candidat comme motif de liaison potentiel aux lipides.

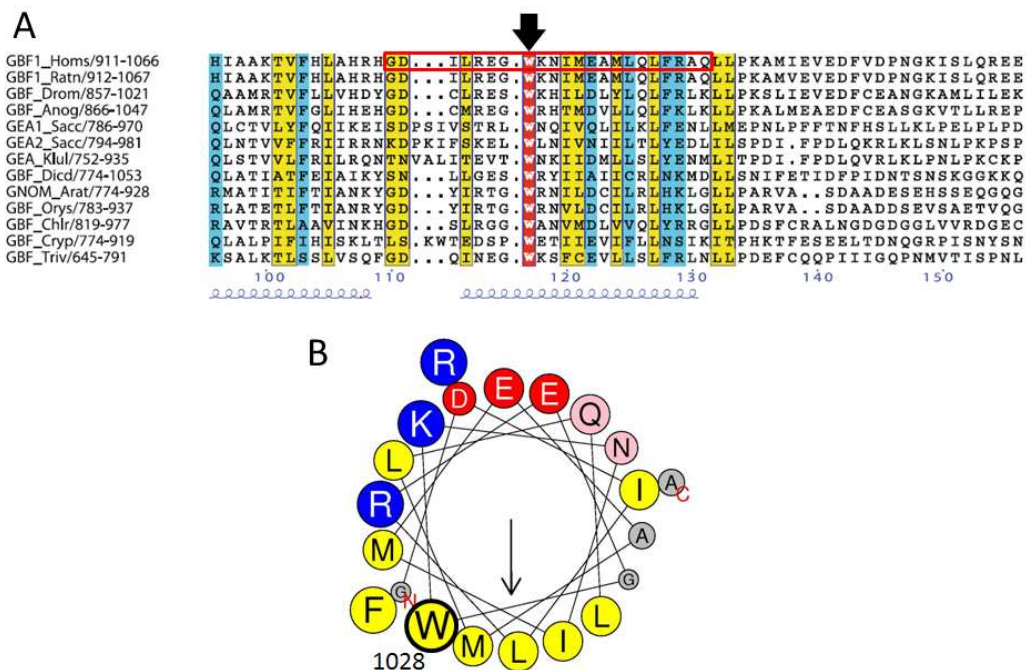


Figure 5-14 : Analyse bioinformatique du domaine HDS1. (A) Alignement de séquence de l'extrémité C-terminale des domaines HDS1 des homologues de GBF1 [360]. La flèche noire indique le tryptophane conservé dans toutes les espèces (B) Représentation de GBF1¹⁰²¹⁻¹⁰⁴¹ (portion de HDS1 encadré dans (A)) montrant une prédiction d'hélice amphipatique. La prédiction des propriétés amphipatiques est effectuée avec le logiciel Heliquet (heliquet.ipmc.cnrs.fr). Le tryptophane 1028 est situé au cœur de la face hydrophobe.

Nous avons donc décidé de construire un mutant de HDS1 délété de l'hélice amphipatique prédite. Ce mutant exprimé dans des cellules HeLa traitées à l'acide oléique (Figure 5-15) montre une moins bonne localisation autour des gouttelettes lipidiques. Ce résultat indique que cette portion C-terminale du domaine HDS1 est nécessaire pour la localisation autour des gouttelettes lipidiques.

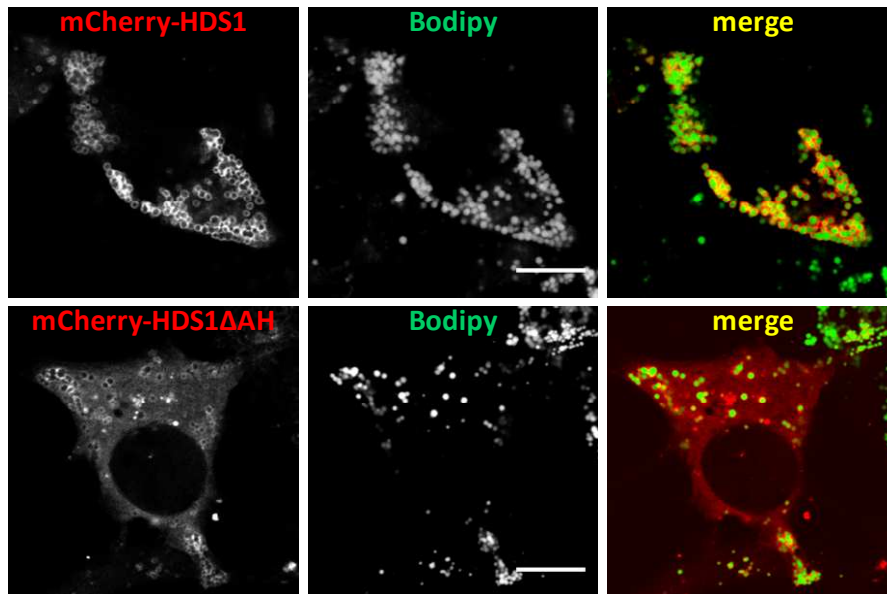


Figure 5-15 : L'hélice amphipatique (AH) située en C-terminal du domaine HDS1 est importante pour la localisation du domaine autour des gouttelettes lipidiques. Images confocales de cellules HeLa exprimant mCherry-HDS1 ou mCherry-HDS1 Δ AH traitées avec 400 μ M d'acide oléique pendant 16h à 37°C, fixées et marquées au Bodipy. (barre d'échelle = 10 μ m).

En utilisant la méthode de quantification décrite précédemment, nous pouvons montrer que la délétion des 20 acides aminés en C-terminal du domaine HDS1 induit une augmentation d'un facteur 3 de l'intensité du signal cytosolique (Figure 5-16). Cette quantification montre aussi que le domaine HDS1 délété de l'hélice amphipatique AH possède encore la capacité de liaison aux gouttelettes lipidiques car le signal n'est pas entièrement cytosolique (comparer *mCherry* et Δ AH sur la Figure 5-16). L'hélice amphipatique est donc nécessaire pour l'association aux gouttelettes lipidiques mais d'autres portions du domaine sont aussi importantes.

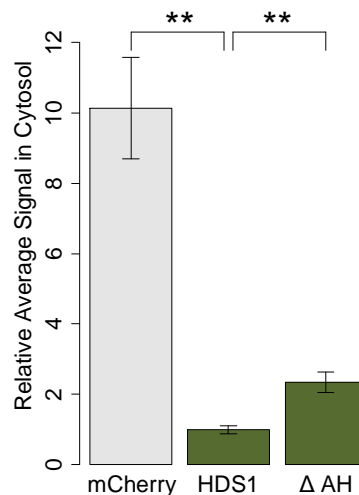


Figure 5-16 : Quantification du déplacement du domaine HDS1 suite à la délétion de l'hélice amphipatique (AH). Représentation de la hauteur du plateau déterminée comme indiqué sur la Figure 5-13 et normalisée par rapport à HDS1. La hauteur de la barre est proportionnelle à l'intensité de signal dans le cytosol. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95%. ** p-value $<10^{-6}$ (test de Student).

Afin de tester l'hypothèse d'une hélice amphipatique dans la région C-terminale de HDS1, nous avons construit des mutants ponctuels induisant l'altération de la propriété amphipatique de l'hélice prédite. La localisation autour des gouttelettes des différents mutants a été déterminée comme précédemment décrit. Les mutations des résidus hydrophobes de la face apolaire (L1024 et W1028) (Figure 5-17 A) induisent une diminution de l'association aux gouttelettes lipidiques, mesurée par une augmentation du signal cytosolique (Figure 5-17 B, *Hydrophobic side*). La mutation de la leucine prédite pour être au centre de l'hélice a un effet majeur alors que les résidus adjacents n'ont pas d'effet. La triple mutation de trois résidus de la face apolaire (L1024A-I1031A-L1038A) a ainsi le même effet que la mutation L1024A seule. La mutation des résidus chargés de la face polaire induit aussi une diminution de l'association aux gouttelettes lipidiques (Figure 5-17 B, *Polar side*). Le double mutant du tryptophane conservé (W1028) et d'une lysine dans la face polaire (K1029) possède l'effet le plus important sur la localisation du domaine HDS1 (Figure 5-17 B, WKSS). Cependant, l'insertion d'une charge à l'interface (mutation I1023K) ne modifie pas la localisation du domaine.

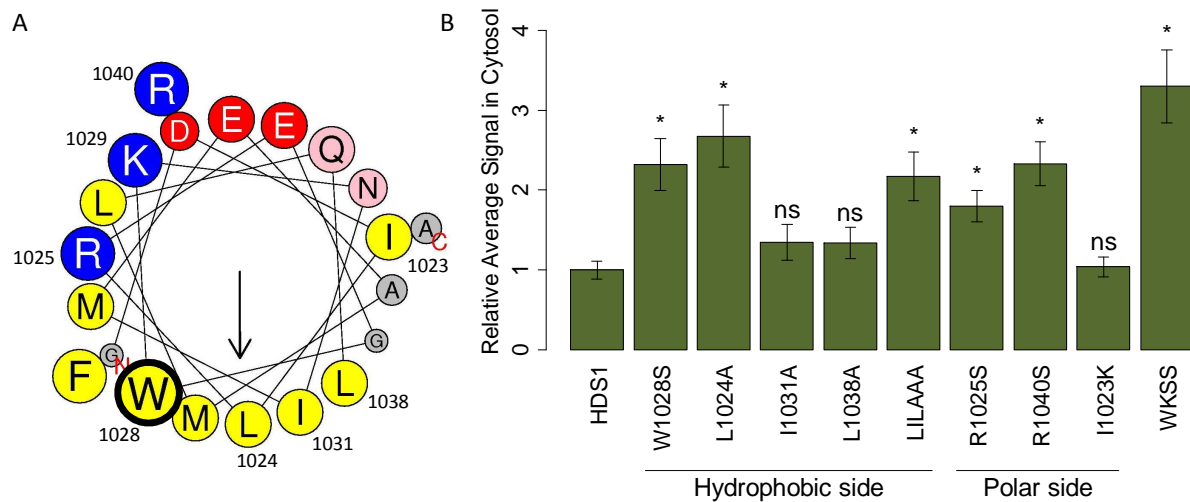


Figure 5-17 : Les mutations ponctuelles affectant l'amphipaticité de l'hélice C-terminal du domaine HDS1 induisent un déplacement de la localisation du domaine dans le cytosol. (A) Représentation de l'hélice AH (GBF1¹⁰²¹⁻¹⁰⁴¹) indiquant la position des résidus mutés. (B) Quantification selon la méthode décrite de la localisation autour des gouttelettes lipidiques des mutants indiqués. L1LAAA : HDS1^{L1024A-I1031A-L1038A} ; WKSS : HDS1^{W1028S-K1029S}. * p-value < 0,001 ; ns : p-value > 0,001 (test de Student).

Ces résultats sont conformes à l'hypothèse d'une hélice, ayant des propriétés amphipatiques, située en C-terminal du domaine HDS1 nécessaire pour la localisation du domaine sur la monocouche des gouttelettes lipidiques. L'hélice amphipatique ne s'insère que dans l'une des couches de la membrane et est de ce fait un bon motif d'interaction aux monocouches entourant les gouttelettes lipidiques. L'utilisation d'une hélice amphipatique pour cibler les gouttelettes lipidiques a été montrée pour d'autres protéines [361], [362].

5.2.3 L'hélice amphipatique est suffisante pour l'association aux gouttelettes lipidiques

Afin de montrer que l'hélice AH est suffisante pour la localisation aux membranes, nous l'avons exprimée seule en fusion avec mCherry ou la GFP dans les cellules HeLa traitées à l'acide oléique. Cette hélice de 20 acides aminés est capable de relocaliser mCherry autour des gouttelettes lipidiques dans les cellules vivantes (Figure 5-18).

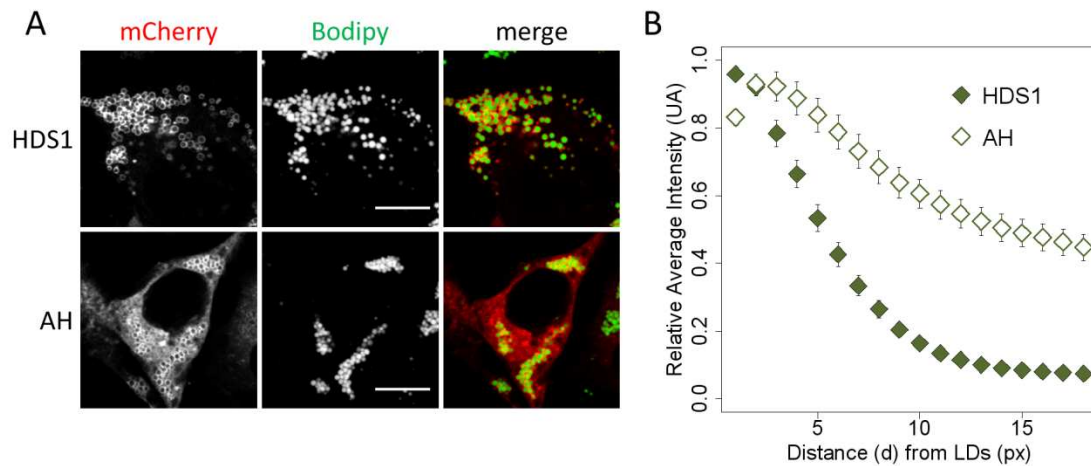


Figure 5-18 : Localisation de l'hélice AH du domaine HDS1 autour des gouttelettes lipidiques. (A) Image confocale de cellules HeLa exprimant HDS1 ou AH en fusion avec mCherry, traitée à l'acide oléique, fixées et marquées au Bodipy. (barre d'échelle = 10 μ m) ; (B) Quantification de la localisation du domaine HDS1 et de l'hélice AH autour des gouttelettes lipidiques.

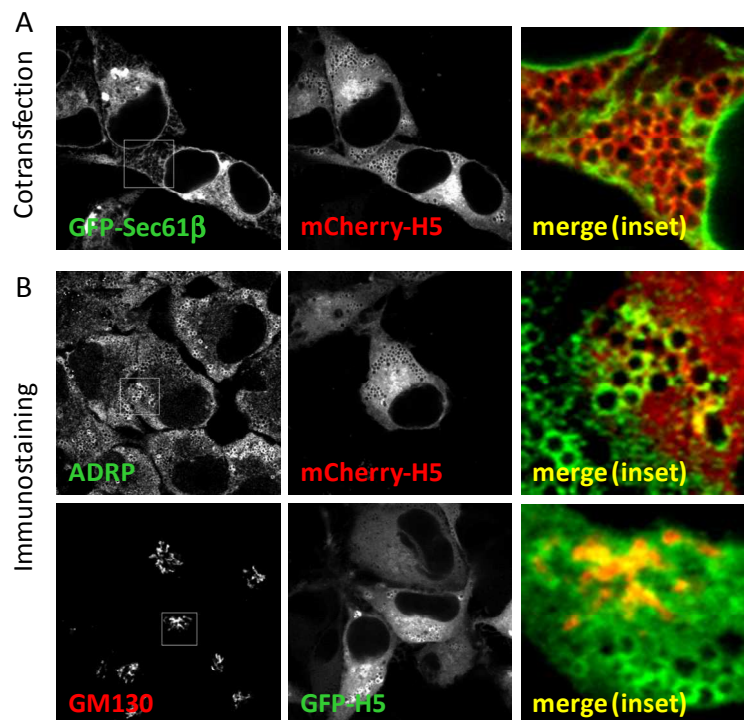


Figure 5-19 : Localisation de l'hélice amphipatique AH. Images confocales de cellules HeLa exprimant l'hélice AH et cotransfectées avec GFP-Sec61 β (marqueur du réticulum endoplasmique) (A) ou immunomarquées (B) avec un anticorps dirigé contre ADRP (marqueur des gouttelettes lipidiques) ou GM130 (marqueur du cis-Golgi).

Cependant, la fixation des cellules induit une délocalisation dans le cytoplasme (Figure 5-18 A, images *AH*). Nous pouvons aussi noter un marquage périnucléaire plus intense (Figure 5-19). Afin de déterminer sur quelle endomembrane cette hélice est localisée, nous avons réalisé des colocalisations avec des marqueurs de la voie sécrétoire précoce (Figure 5-19).

Nous pouvons remarquer que les gouttelettes sont très proches du réticulum endoplasmique mais que l'hélice n'est pas colocalisée avec Sec61 β . En revanche, l'hélice montre une colocalisation partielle avec ADRP (PLIN2) qui sont toutes deux localisées autour des gouttelettes lipidiques (Figure 5-19 (B)). L'hélice *AH* montre aussi une concentration dans la région périnucléaire qui colocalise partiellement avec GM130. Ces résultats montrent que l'hélice *AH* possède la capacité intrinsèque de se localiser autour des gouttelettes lipidiques ainsi que sur le Golgi, tout comme GBF1.

Le comportement de l'hélice amphipatique est semblable à la localisation de GBF1 (localisation sur les membranes de la voie sécrétoire précoce ainsi que sur la monocouche des gouttelettes lipidiques). Nous avons donc voulu connaître la force de l'association de l'hélice autour des gouttelettes lipidiques en menant une analyse par FRAP comme pour le domaine HDS1. Ces analyses montrent un recouvrement de 60% de la fluorescence autour des gouttelettes lipidiques ($t_{1/2}=32$ s) (Figure 5-20). L'hélice amphipatique montre une dynamique sur les membranes intermédiaires entre GBF1 ($t_{1/2}=13$ s) et HDS1 (pas de recouvrement de fluorescence).

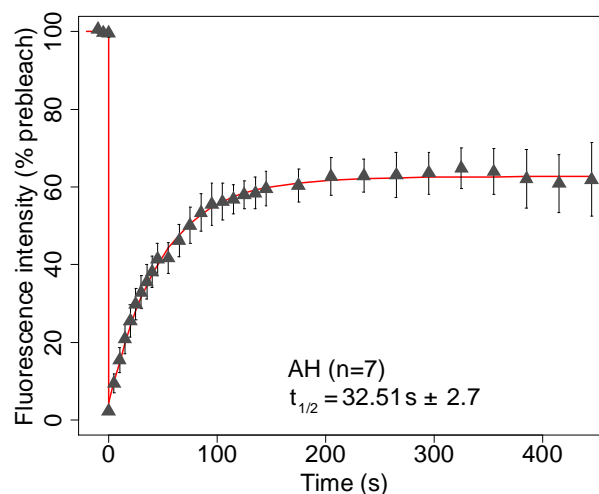


Figure 5-20 : Dynamique de l'hélice *AH* autour des gouttelettes lipidiques. Analyse de la dynamique de l'hélice *AH* par FRAP dans des cellules HeLa transitoirement transfectées et traitées à l'acide oléique. $t_{1/2}$ déterminé comme dans la Figure 5-3.

6 Régulation de la localisation de GBF1

6.1 La structure modulaire de GBF1 permet de réguler son activité

6.1.1 Régulation par le domaine Sec7

Nous avons montré que le domaine HDS1 est exclusivement localisé autour des gouttelettes lipidiques dans des cellules traitées à l'acide oléique. De plus, l'association de ce domaine aux gouttelettes est très stable ce qui implique une régulation de sa localisation dans le contexte de la protéine entière. Cependant, dans les mêmes conditions, une très faible part de GBF1 est associée aux gouttelettes lipidiques. Afin de déterminer quels domaines sont importants pour la régulation de la localisation du domaine HDS1, nous avons ajouté les domaines situés en N-terminal du domaine. En effet, le tandem HDS1-HDS2 est aussi localisé autour des gouttelettes lipidiques [46], suggérant un rôle redondant de ces deux domaines. De plus, les délétions des domaines HDS1, HDS2 ou du tandem HDS1-HDS2 ont le même effet sur la localisation de GBF1 (Figure 5-7 B).

Nous avons exprimé dans les cellules HeLa traitées à l'acide oléique le tandem Sec7-HDS1 fusionné à la GFP. De façon surprenante, le tandem Sec7-HDS1 montre une localisation cytoplasmique (Figure 6-1), sans concentration autour des gouttelettes lipidiques et sans concentration apparente dans la région Golgienne (Figure 6-2). Le traitement à la BFA ne modifie pas la localisation du tandem dans les cellules.

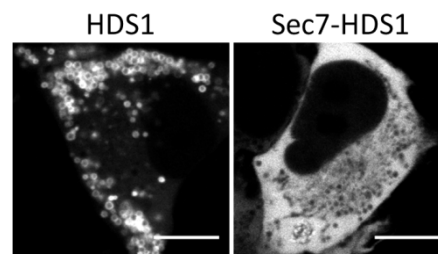


Figure 6-1 : Images confocales de cellules HeLa vivantes exprimant Venus-HDS1 ou GFP-Sec7-HDS1 et traitées à l'acide oléique. Barre d'échelle = 10 μ m.

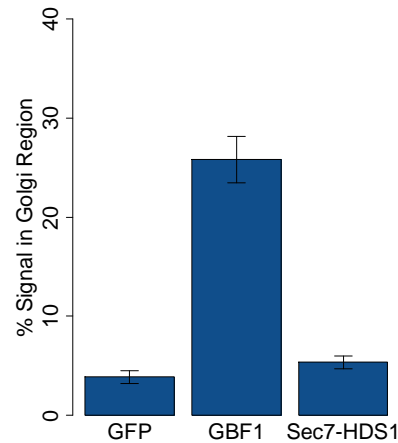


Figure 6-2 : Quantification de la localisation dans la région Golgienne du tandem Sec7-HDS1. Les cellules HeLa transitoirement transfectées par les constructions indiquées de GBF1 sont fixées et traitées pour visualiser le *cis*-Golgi (marquage GM130). La localisation au Golgi est quantifiée comme précédemment (Figure 5-7).

Afin de tester la possibilité d'une localisation du tandem Sec7-HDS1 sur une membrane interne (réticulum endoplasmique par exemple), nous avons réalisé le fractionnement subcellulaire de cellules HeLa exprimant le tandem Sec7-HDS1 non traitées à l'acide oléique (Figure 6-3). La GFP est une protéine purement cytosolique et fortement surexprimée comme l'indique l'intensité de la bande dans la fraction cytosolique (Figure 6-3 A). Comme attendu le domaine Sec7 est cytosolique alors que le domaine HDS1 est retrouvé dans la fraction membranaire ; 90% du pool du tandem Sec7-HDS1 est dans la fraction cytosolique.

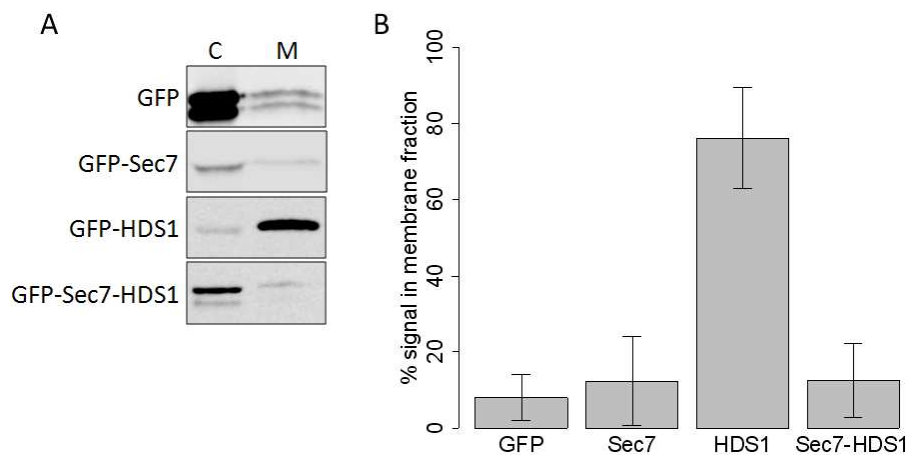


Figure 6-3 : Fractionnement subcellulaire de cellules HeLa exprimant la GFP seule ou fusionnée aux domaines Sec7 ou HDS1 ou au tandem Sec7-HDS1. (A) Image de western blot représentative de trois transfections indépendantes. C= fraction cytosolique et M= fraction membranaire ; (B) Quantification de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type.

Ces résultats montrent que la capacité de fixation aux membranes du domaine HDS1 est fortement inhibée par le domaine Sec7. De plus, des études *in vitro* de biochimie menées au laboratoire ont montré que le tandem Sec7-HDS1 purifié n'est plus capable de fixer des liposomes ou des gouttelettes lipidiques artificielles (Bouvet S., J Cell Sci. *in press*). Ces résultats indiquent une interaction possible entre ces deux domaines induisant une inhibition ou un masquage du

domaine de fixation aux lipides. Cependant, aucune interaction entre le domaine Sec7 et le domaine HDS1 n'a été montrée dans une étude d'interaction domaine/domaine en double hybride en levure [45].

6.1.2 Régulation par les domaines N-terminaux

Ni la localisation du domaine HDS1, ni celle du tandem Sec7-HDS1 ne permettent d'expliquer la localisation de la protéine entière à la fois *in vivo* et *in vitro*, suggérant des mécanismes supplémentaires de ciblage aux membranes. La délétion des domaines C-terminaux après le domaine HDS2 n'empêche pas la localisation sur les membranes de GBF1, indiquant que l'extrémité C-terminale de la protéine n'est pas requise pour la localisation de GBF1 sur les membranes de la voie sécrétoire précoce (ERGIC et Golgi). De plus, la délétion du domaine DCB situé à l'extrémité N-terminale de GBF1 entraîne une perte de la localisation de GBF1 sur les membranes, ce qui montre que des informations de localisation sont contenues dans la partie N-terminale de la protéine. Afin de tester la capacité de ces mutants à fixer les membranes, nous avons réalisé le fractionnement subcellulaire de cellules HeLa exprimant différents mutants de GBF1 (Figure 6-4). De façon surprenante, la délétion du domaine DCB ou des domaines DCB et HUS n'induit qu'une faible diminution, non significative, du pool membranaire de GBF1.

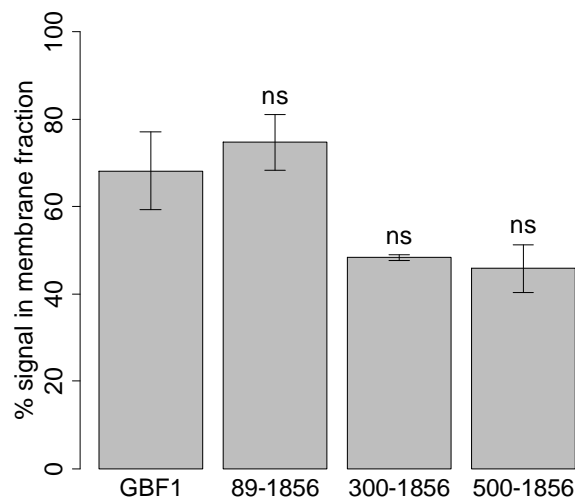


Figure 6-4 : Fractionnement subcellulaire de cellules HeLa exprimant GBF1 entier ou des troncatures des domaines N-terminaux. Les barres d'erreurs représentent l'écart type. ns= p-value > 0,01 (test de Student).

Cela implique que les domaines N-terminaux portent une information de ciblage membranaire mais ne sont pas des domaines de fixation aux membranes. Selon cette hypothèse, les domaines HDS1 et HDS2 sont des domaines de liaisons aux lipides. Afin d'étudier cela, nous avons ajouté les domaines HUS et HDS2 au tandem Sec7-HDS1 (GBF1²¹¹⁻¹²⁷⁸). Cette construction, cytoplasmique, en absence de traitement (image non montrée) est partiellement localisée autour des gouttelettes lipidiques lors d'un traitement à l'acide oléique (Figure 6-5).

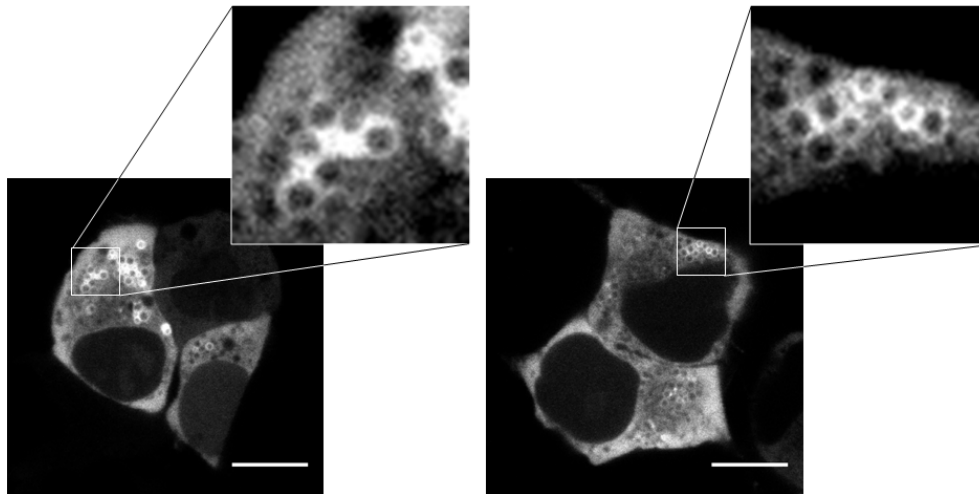


Figure 6-5 : Images confocales de cellules HeLa vivantes exprimant GFP-GBF1²¹¹⁻¹²⁷⁸ et traitées à l'acide oléique. Barre d'échelle = 10 µm.

La capacité de GBF1²¹¹⁻¹²⁷⁸ à fixer les membranes a ensuite été confirmée par fractionnement subcellulaire de cellules HeLa non traitées à l'acide oléique (Figure 6-6). Ces résultats indiquent que GBF1²¹¹⁻¹²⁷⁸, comme la troncature du domaine DCB, est incapable d'être accumulée sur les membranes de la voie sécrétoire, y compris lorsque les cellules sont traitées par la BFA. Cependant, cette construction conserve la capacité à fixer les membranes sans traitement à l'acide oléique. Dans le cas d'un traitement à l'acide oléique, GBF1²¹¹⁻¹²⁷⁸ est capable de se concentrer autour des gouttelettes lipidiques comme le domaine HDS1 avec, cependant, un plus fort niveau dans le cytoplasme. Ainsi, le domaine HUS n'est pas suffisant pour cibler GBF1 sur les membranes de la voie sécrétoire précoce et la présence du domaine DCB est nécessaire pour un ciblage correct de GBF1 au Golgi.

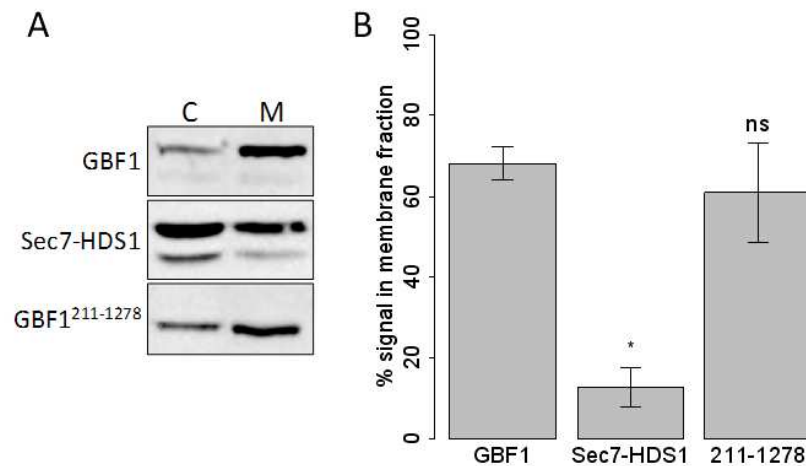


Figure 6-6 : Fractionnement subcellulaire de cellules HeLa exprimant GFP-GBF1, GFP-Sec6HDS1 ou GFP-GBF1²¹¹⁻¹²⁷⁸ (211-1278) (A) Image de western blot représentative de trois transfections indépendantes. C= fraction cytosolique et M= fraction membranaire ; (B) Quantification de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type. * p-value < 0,001 ; ns= p-value > 0,01 (test de Student).

6.2 GBF1, une plateforme de coordination ?

6.2.1 L'interactome de GBF1 indique une protéine hyperconnectée

Les résultats de localisation de GBF1 décrits ci-dessus peuvent impliquer l'existence d'autres facteurs importants de localisation, notamment des facteurs transmembranaires. Afin de trouver des nouveaux partenaires de GBF1, une étude de protéomique a été menée par Alexis Gautreau (LEBS, Gif-Sur-Yvette). Une construction exprimant GBF1 avec deux étiquettes moléculaires distinctes est exprimée conditionnellement dans les cellules HEK293T. GBF1 et ses interacteurs possibles sont ensuite purifiés séquentiellement en utilisant ces deux étiquettes (Figure 6-2). Le contenu ainsi purifié est ensuite analysé par spectrométrie de masse.

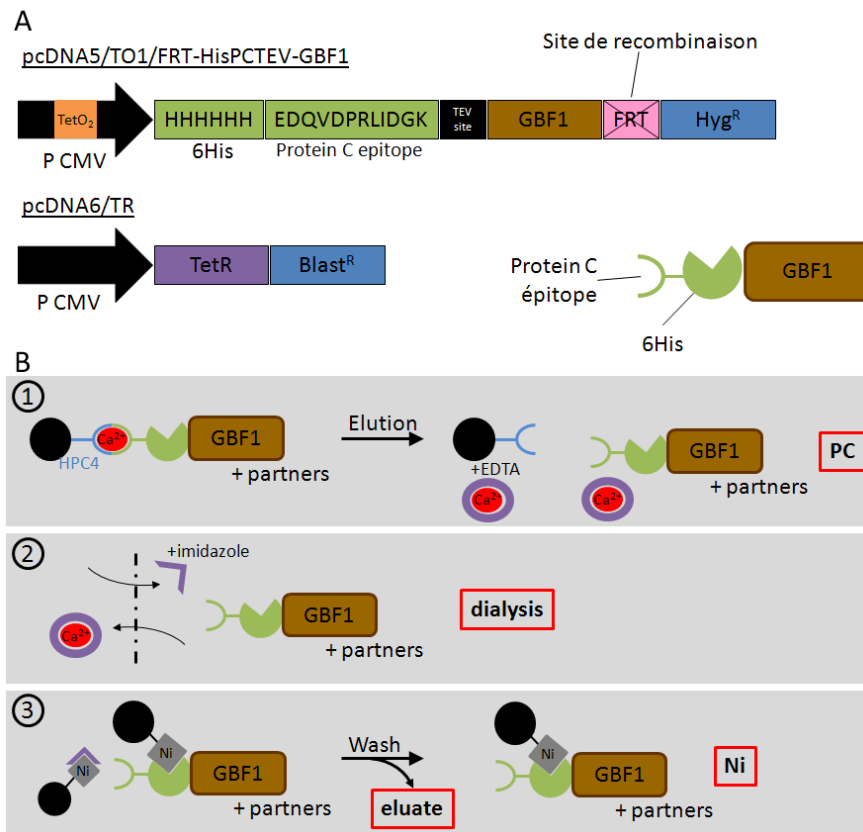


Figure 6-7 : Méthodologie utilisée pour la recherche des partenaires de GBF1 (*interactome*). (A) Schéma des constructions utilisées. TEV site ; site de protéolyse. FRT ; site de recombinaison avec la séquence FRT incluse dans le génome de la lignée cellulaire utilisée. Hyg^R ; gène de résistance à l'hygromycine. P CMV ; promoteur fort du cytomégalovirus. TetR ; répresseur sensible à la tetracycline se liant à la séquence TetO₂. Blast^R ; gène de résistance à la blasticidine. (B) Principe de la purification séquentielle de GBF1 (1) Purification calcium dépendante de l'épitope C, élution par ajout d'EDTA qui complexe le calcium permettant de rompre la liaison épitope C-anticorps. (2) dialyse pour éliminer l'EDTA-calcium et pour ajouter de l'imidazole. (3) purification de l'étiquette hexahistidine par des billes couplées au nickel (Ni) par compétition avec l'imidazole. Les étiquettes moléculaires sont ensuite clivées pour permettre de récupérer dans l'éluât GBF1 et ses partenaires.

Cette étude a permis de mettre en évidence 118 partenaires physiques potentiels de GBF1. Nous identifions dans cette étude des partenaires connus de GBF1 (comme COPI par exemple) [47] ce qui permet de valider nos résultats. Parmi les nouveaux partenaires, nous retrouvons des protéines non-golgiennes connues ou dont la fonction dans le trafic n'est pas décrite (notamment de nombreux transporteurs mitochondriaux). Ces partenaires, s'ils sont confirmés, peuvent être liés à d'autres rôles de GBF1.

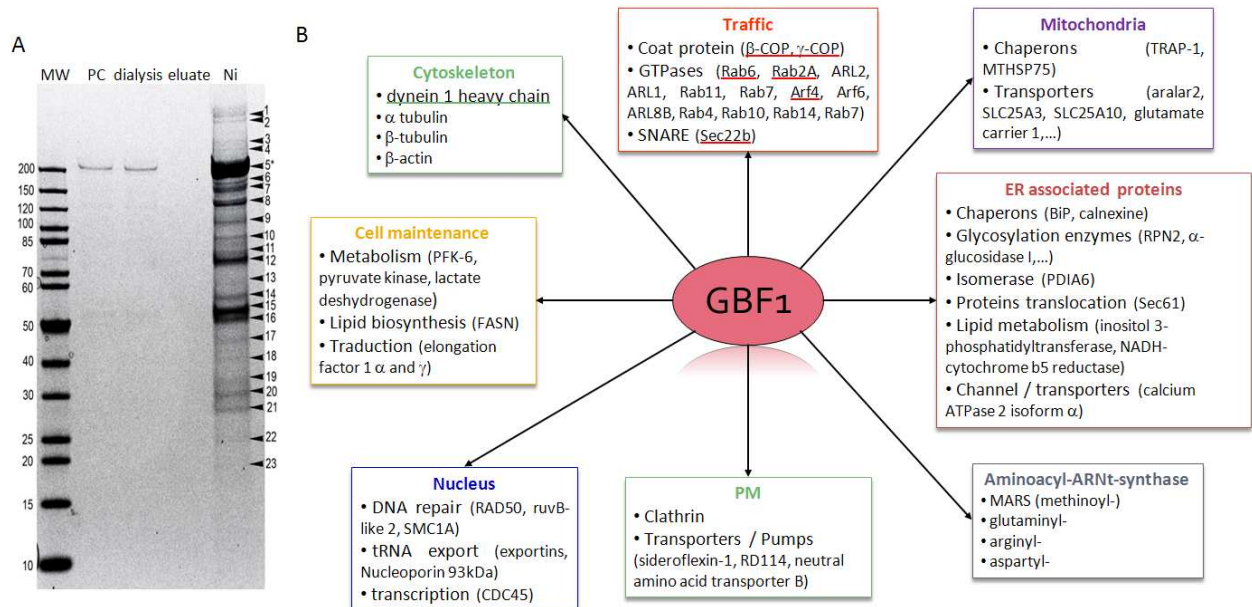


Figure 6-8 : Résultat de l'étude de l'interactome de GBF1. (A) Séparation électrophorétique des différentes étapes de la purification séquentielle de GBF1 (voir Figure 6-7). (B) Représentation arbitraire des résultats de l'analyse par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) des 23 bandes identifiées sur le gel (A). Comme tentative de classement, les protéines identifiées sont regroupées par localisation (mitochondrie, réticulum endoplasmique, noyau et membrane plasmique (PM)) ou par fonction (maintenance cellulaire, trafic intracellulaire, cytosquelette).

Parmi les petites protéines G retrouvées nous avons pour le moment confirmé l'interaction entre Rab6 et GBF1 par double hybride en levures (Stéphanie Miserey-Lenkei, Institut Curie, *non publié*). Le mutant Rab6A-T27N (dominant négatif) interagit avec le domaine Sec7 et le mutant Rab6-Q72L (constitutivement actif) interagit avec l'extrémité N-terminale de la protéine (site d'interaction déjà décrit avec Rab1B-GTP). Le rôle de cette interaction n'a pour l'instant pas été clarifié. La déplétion de GBF1 par ARN interférent provoquerait une tubulation du TGN. En revanche, dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) génétiquement dépourvue de Rab6 (Rab6 KO), GBF1 semble être normalement localisé (Carina Santos, Institut Curie, *non publié*). Rab6 et GBF1 ne sont pas colocalisés mais des études récemment publiées [363], [364] mettent en évidence un rôle de GBF1 au niveau du *trans*-Golgi. Des expériences complémentaires en collaboration avec l'équipe de Bruno Goud, spécialisée sur l'étude des Rab permettront de mieux définir la signification de cette interaction.

6.2.2 GBF1, l'intermédiaire entre Rab1 et Arf1 ?

Rab1 recrute GBF1

Des données récentes montrent une interaction entre Rab1B et GBF1 *via* le domaine DCB [48]. Rab1 existe sous deux isoformes (Rab1A et Rab1B) qui auraient des rôles redondants dans le contrôle des étapes précoces du trafic à partir des ERES [99]. Ainsi, la déplétion de Rab1B induit une fragmentation du Golgi [48] comparable à l'effet de la BFA. L'expression d'un mutant constitutivement inactif de Rab1 (S25N) induit aussi une fragmentation du Golgi [365]. Récemment, un rôle de Rab1 dans les voies de trafic non conventionnelle a aussi été documenté [366], [367].

Une étude d'ARN interférent dirigé contre Rab1A ou Rab1B montre une délocalisation de GBF1 [368]. Afin de savoir si GBF1 est relocalisée au niveau d'autres compartiments de la voie sécrétoire précoce, j'ai effectué une analyse de la localisation de GBF1 dans les cellules traitées par ARN interférent dirigé contre Rab1. Nous avons choisi de dépléter les cellules pour Rab1A et Rab1B simultanément, pour se prémunir d'un sauvetage éventuel par l'autre isoforme. Nous avons dans un premier temps décidé d'analyser le phénotype des cellules après deux jours de traitement pour éviter l'accumulation d'effets secondaires. Malheureusement, je n'ai pas pu observer d'effet significatif sur la localisation de GBF1 ou sur la fragmentation du Golgi malgré une bonne déplétion des deux isoformes de Rab1 (environ 80%). L'hypothèse est qu'une très faible concentration de Rab1 serait suffisante pour assurer la fonction.

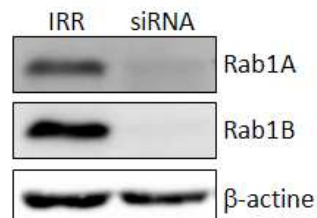


Figure 6-9 : Western blot de vérification de la déplétion de Rab1A et Rab1B après traitement de 3 jours par ARN interférent des cellules RPE-1.

Nous avons alors décidé d'observer le phénotype après trois jours de traitement (Figure 6-9). Comme publié, la déplétion de Rab1 induit une fragmentation du Golgi (Figure 6-10) ainsi qu'une délocalisation partielle de GBF1 endogène dans le cytoplasme (augmentation du marquage diffus dans le cytosol). Nous souhaitons mesurer l'association de GBF1 sur les membranes de la voie sécrétoire précoce, aussi nous avons utilisés les *micropatterns* afin de figer et de standardiser la position des différents compartiments internes. Cette technique permet de quantifier de façon fiable et reproductible la localisation des différents compartiments intracellulaires [352]. Ainsi, sur le *micropattern* en forme d'arbalète (*crossbow*) utilisé, le noyau est au centre et le Golgi est au dessus (vers l'arc de l'arbalète) [351]. Dans les cellules traitées avec un ARN interférent dirigé contre Rab1A et Rab1B et *micropatternées*, nous pouvons observer une plus forte intensité du signal dans le cytoplasme (Figure 6-11 B entre 0 et 100 et entre 200 et 325).

L'intensité est similaire sur le Golgi entre les cellules traitées et les cellules contrôles.

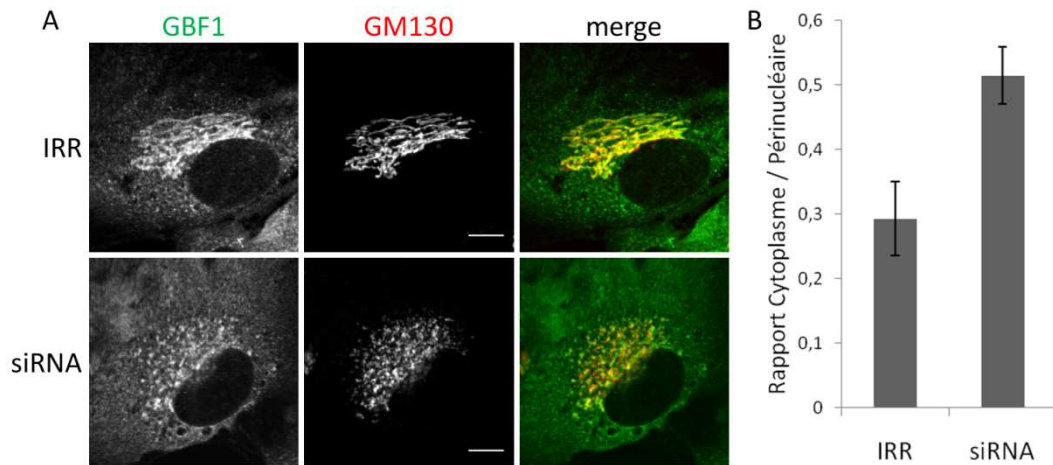


Figure 6-10 : La déplétion de Rab1A et Rab1B provoque la fragmentation du Golgi et la délocalisation partielle de GBF1. (A) Images confocales de cellules RPE-1 immunomarquées contre GM130 et GBF1. IRR : Irrelevant RNA ; siRNA : cellules traitées avec un pool d'ARN interférent dirigé contre Rab1A et Rab1B. Barre d'échelle = 10 μ m ; (B) quantification de la localisation de GBF1 (rapport entre l'intensité moyenne du signal périnucléaire et cytoplasmique de GBF1). Les barres d'erreur représentent l'écart type.

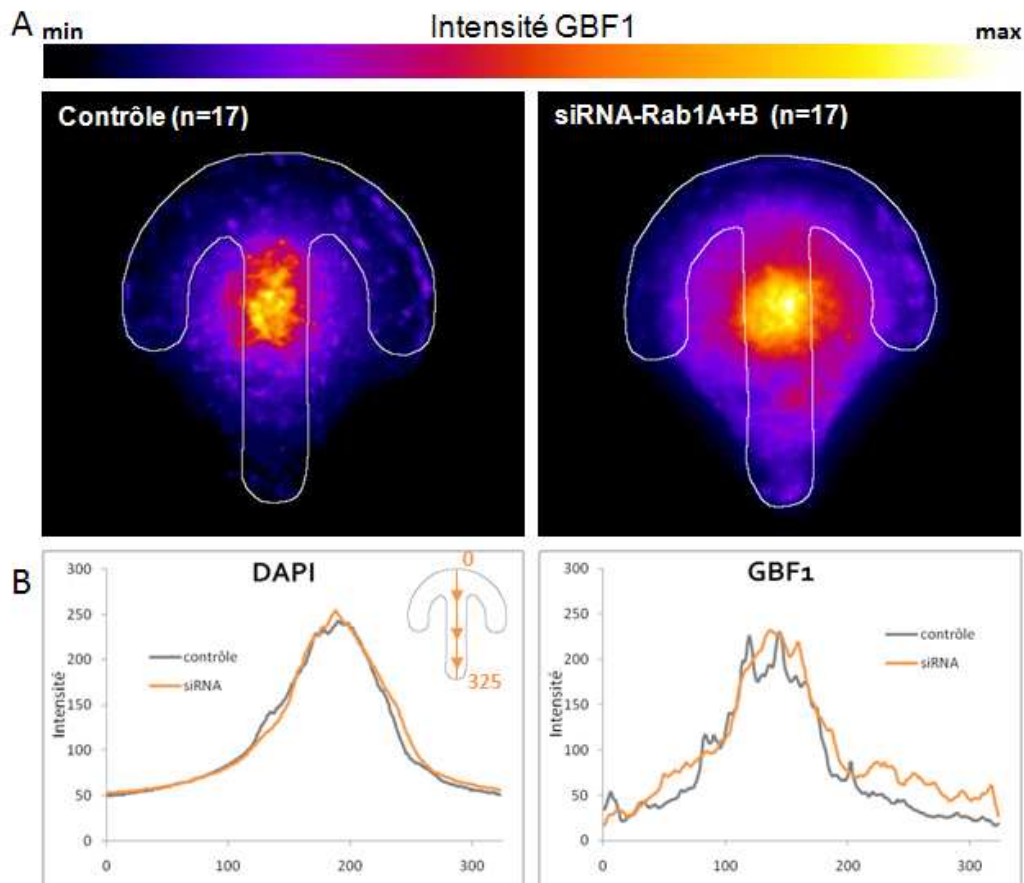


Figure 6-11 : Localisation de GBF1 dans les cellules RPE-1 micropatternées traitées ou non avec un ARN interférent dirigé contre Rab1A et Rab1B. (A) Cellules de référence obtenue par projection du signal moyen de 17 cellules centrées et alignées par rapport au micropattern. L'échelle de couleur indique les variations d'intensité du signal GBF1 ; (B) Projection de l'intensité le long du grand axe du micropattern pour le signal DAPI (noyau) et le signal GBF1.

Pour étudier l'importance de Rab1B dans la localisation de GBF1 sur les membranes, nous décidons d'étudier l'effet d'une délocalisation de Rab1B sur la localisation de GBF1. Pour cela, l'expression d'une protéine chimère GFP-Rab1B Δ CC- κ Ras4B(171-188) permet de localiser Rab1B (sauvage, ou Q67L – constitutivement actif, ou I121N – dominant négatif) à la membrane plasmique (Figure 6-12 c).

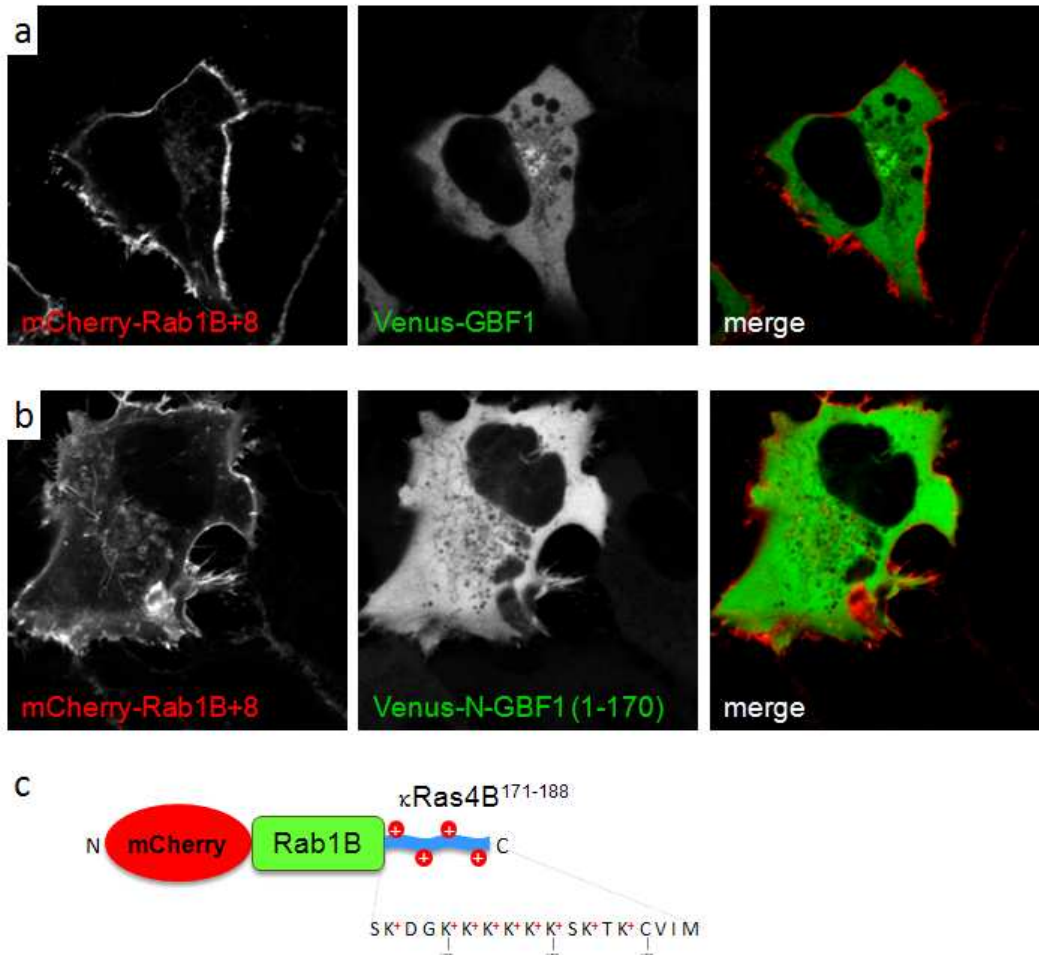


Figure 6-12 : La délocalisation de Rab1B n'induit pas celle de GBF1. Cellules HeLa transitoirement transfectées par mCherry-Rab1B- κ Ras4B (mCherry-Rab1B+8) et Venus-GBF1 entier (a) ou N-terminal (b) puis observées au confocal après fixation ; (c) schéma de la construction utilisée. L'étiquette C-terminale, riche en lysine (K) interagit avec la membrane plasmique, riche en phosphatidylsérine (chargée négativement).

GBF1 endogène n'est pas visiblement relocalisé à la membrane plasmique lors de l'expression de la chimère Rab1B- κ Ras4B (non montré). Cependant, la localisation de GBF1 endogène dépend de nombreux paramètres, entre autre un domaine de liaison aux lipides. Nous avons donc coexprimé l'extrémité N-terminale de GBF1 (GBF1-1-170) avec la chimère mCherry-Rab1B Δ CC- κ Ras4B(171-188) dans les cellules HeLa. Dans ces conditions, le domaine DCB ne présente pas de localisation périphérique et reste cytoplasmique (Figure 6-12). Ces expériences indiquent que la petite protéine G Rab1B n'est pas suffisante pour la localisation de GBF1. L'hypothèse est que GBF1 nécessite aussi un domaine de liaison sur une membrane non chargée (HDS1 et HDS2). Or le feuillet interne de la membrane plasmique est enrichi en PS et présente donc une charge négative. Ces charges

peuvent avoir un effet répulsif sur GBF1. De plus, les cellules expriment toujours Rab1 endogène qui pourrait être suffisant pour masquer les effets de la chimère.

Rôle de Rab1 vers les gouttelettes lipidiques

Rab1 est l'une des Rab retrouvée en association avec les gouttelettes lipidiques dans les études de protéomique (cf. 3.2.1 ci-dessus). L'expression de la forme dominant-négative de Rab1B inhibe la formation des gouttelettes lipidiques dans la lignée de cellules hépatique Huh7 [369]. Ces données suggèrent que la voie de trafic vésiculaire précoce est importante dans la formation des gouttelettes lipidiques. Pour monter cela, la formation de gouttelettes lipidiques a été induite par l'acide oléique dans des cellules HeLa traitées avec différents ARN interférents dirigés contre la voie sécrétoire précoce. La déplétion de GBF1 ou de Rab1A et Rab1B induisent une diminution de la quantité de la petite protéine G Arf mesurée par western blot (Figure 6-13).

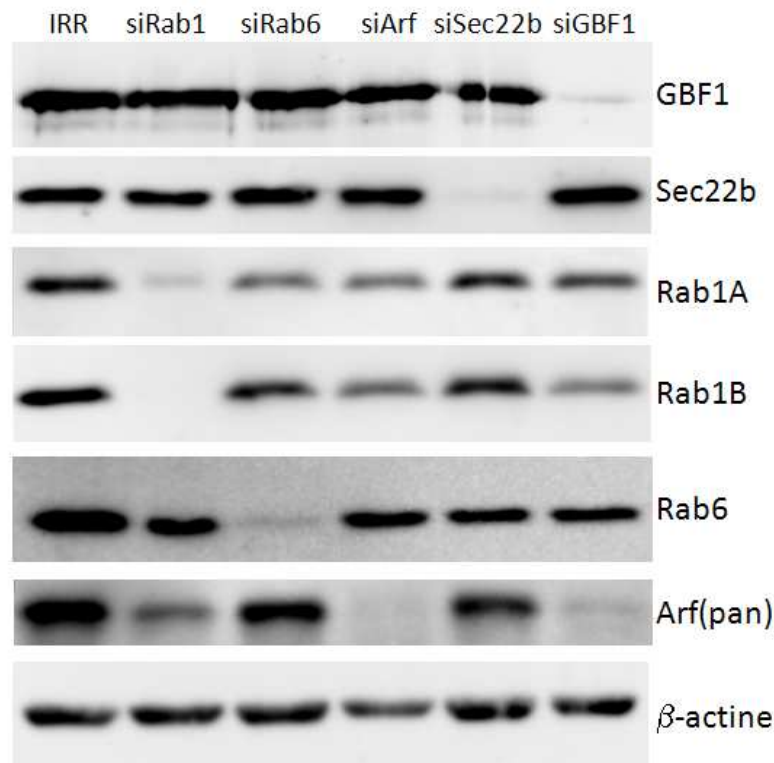


Figure 6-13 : Expression des acteurs de la voie sécrétoire précoce lors d'un traitement par ARN interférent. Les cellules RPE-1 traitées avec un pool d'ARN interférent dirigé contre les protéines indiquées (au dessus) ont été lysées après trois jours de traitement. IRR : ARN interférent contrôle (*irrelevant RNA*) ; siRab1 : déplétion de Rab1A et Rab1B ; siArf : déplétion de Arf1 et Arf4.

Les travaux de notre équipe ont montré une interaction directe entre GBF1 et ATGL. Cette interaction permet le recrutement de la lipase aux gouttelettes lipidiques par la voie GBF1-Arf1-COPI [46]. Dans les cellules HeLa, la déplétion de GBF1 induit une diminution de la quantité d'ATGL (Figure 6-14). De même, mais dans une moindre mesure, la déplétion de Arf1-4 induit aussi une diminution de la quantité d'ATGL totale. Cela pourrait indiquer qu'un défaut de localisation d'ATGL provoque sa dégradation ou que la voie GBF1-Arf1-COPI active l'expression d'ATGL.



Figure 6-14 : Expression d'ATGL après un traitement de 3 jours par ARN interférent (même cellules que dans la Figure 6-13).

Cependant, la déplétion de Rab1A et Rab1B, comme la déplétion de GBF1 induisent un défaut de localisation d'ADRP autour des gouttelettes lipidiques (Figure 6-15). Dans cette expérience, la localisation d'ATGL autour des gouttelettes n'a pas pu être observée à cause de l'absence d'anticorps utilisable en immunofluorescence.

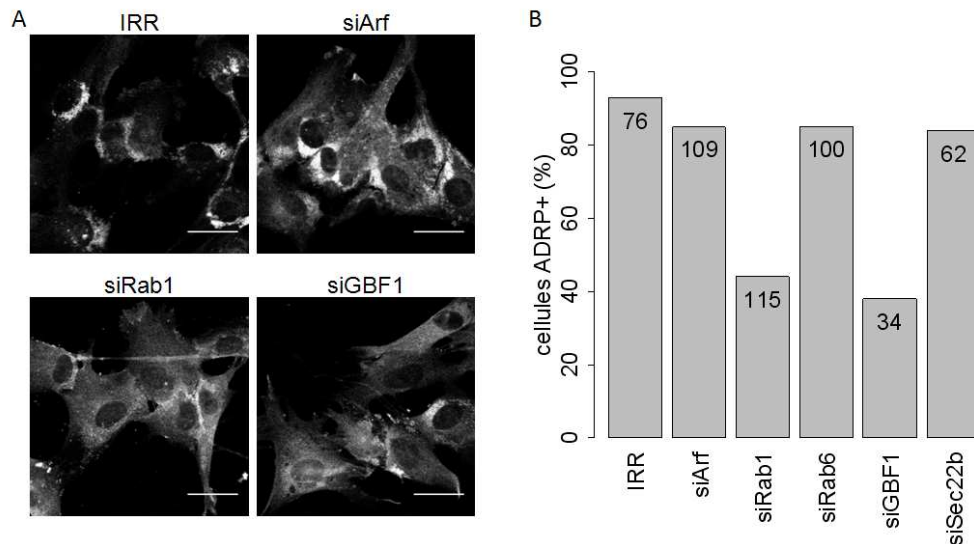


Figure 6-15 : Recrutement d'ADRP autour des gouttelettes lipidiques induites à l'acide oléique dans les cellules traitées par ARN interférent. Cellules RPE-1 traitées pendant 3 jours avec un *pool* d'ARN interférent (même traitement que la Figure 6-13). Au bout de 2 jours, les cellules sont incubées pendant une nuit avec 100 μ M d'acide oléique avant fixation et immunomarquage d'ADRP endogène. (A) Images confocales (40X) et (B) quantification du nombre de cellules présentant une accumulation périnucléaire d'ADRP sur les gouttelettes lipidiques (dans les barres, nombre de cellules dénombrées).

Ces résultats indiquent que Rab1 est important pour l'activité de GBF1 dans le trafic vers les gouttelettes lipidiques. Rab1 pourrait être localisé autour des gouttelettes lipidiques [369] et en contrôlerait leur formation.

Bien que Sec22b ait été retrouvé dans la fraction enrichie en gouttelettes lipidique, sa déplétion ne semble pas avoir d'effet sur le métabolisme des gouttelettes lipidiques (nombre et taille non visiblement différentes des cellules contrôles (non montrée ici), quantité d'ATGL normale, recrutement d'ADRP non affecté).

7 Discussion et Perspectives

7.1 GBF1, coordinateur de l'homéostasie des lipides ?

Rôle de GBF1 dans le trafic vers les gouttelettes lipidiques

GBF1 est majoritairement localisé au niveau du *cis*-Golgi où il contrôle la formation de vésicules COPI permettant le recyclage vers le réticulum endoplasmique (transport rétrograde). Récemment, notre équipe et deux autres ont indépendamment montrées que le système GBF1-Arf1-COPI a été impliqué dans le trafic vers les gouttelettes lipidiques [46], [51], [370], [371]. Ainsi, GBF1 possède une localisation minoritaire à la surface des gouttelettes lipidiques [51].

J'ai montré que le recrutement spécifique du domaine HDS1 aux gouttelettes lipidiques est lié à l'insertion d'une hélice amphipatique. Cette étude *in vivo* de biologie cellulaire a été complétée par une étude *in vitro* de biochimie menée au laboratoire, ce qui a conduit à la publication d'un article dans un journal international à comité de lecture (S. Bouvet, M.-P. Golinelli-Cohen, V. Contremoulins and C. L. Jackson, "Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes.," *Journal of Cell Sciences*. 2013 *in press*). Ces résultats indiquent que GBF1 est localisé sur la monocouche des gouttelettes lipidiques par les domaines HDS1 et HDS2 qui sont des domaines de liaison directe aux lipides.

GBF1 est requis pour la localisation d'au moins deux protéines associées aux gouttelettes lipidiques (ADRP et ATGL). La voie GBF1-Arf1-COPI n'est cependant pas requise pour la formation des gouttelettes lipidiques qui sont formées par accumulation de lipides neutres entre les deux feuillets de la membrane du réticulum endoplasmique. Notre laboratoire a montré qu'il existe une voie de trafic permettant l'adressage de protéines sur les gouttelettes lipidiques. Cela montre que le trafic des protéines vers les gouttelettes lipidiques requiert la machinerie de la formation de vésicules. Cependant, il semble peu probable qu'une vésicule formée d'une bicouche de phospholipides fusionne avec une gouttelette lipidique. La présence de la SNARE Sec22b sur les gouttelettes lipidiques [236] pourrait indiquer un mécanisme de *tethering* de vésicule à la surface des gouttelettes lipidiques. Le rôle des SNARE dans la formation d'un complexe non fusogène permettant de stabiliser les sites de contact membranaire est une hypothèse discutée récemment (Petkovic M., et al. *submitted*).

Les gouttelettes sont en contact étroit avec des membranes dérivant du réticulum endoplasmique ou du ERGIC. Ainsi le passage de protéines pourrait être possible au travers de ces sites de contact. Les sites de contact sont des structures bien définies caractérisées par une grande proximité entre les membranes de deux compartiments différents. GBF1 possède une région de fixation aux gouttelettes lipidiques (les domaines HDS1 et HDS2) et une région de fixation sur le ERGIC

(domaine d'interaction avec Rab1). Ces deux modules indépendants pourraient permettre de stabiliser des sites de contact entre le ERGIC et les gouttelettes lipidiques.

Enfin, un lien physique entre les gouttelettes et le réticulum a été observé par microscopie électronique [231]. Ce *pont membranaire* permet la localisation sur les gouttelettes de DGAT1 et donc la diffusion de lipides permettant la croissance de la gouttelette lipidique. Cette continuité membranaire pourrait permettre de localiser d'autres protéines à la surface des gouttelettes lipidiques par un mécanisme de *surfing*. La formation du pont membranaire semble intimement liée à l'origine réticulo-endoplasmique des gouttelettes lipidiques. Cependant, le pont membranaire entre le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques pourrait aussi être formé par un mécanisme d'hémifusion (Figure 7-1). Pour cela, les deux membranes doivent être accolées (rôle des SNARE associées aux gouttelettes lipidiques ?) avant que les lipides ne se mélangent. La fusion permet de relâcher une partie du stress membranaire causé par la courbure (des vésicules ou des gouttelettes lipidiques).

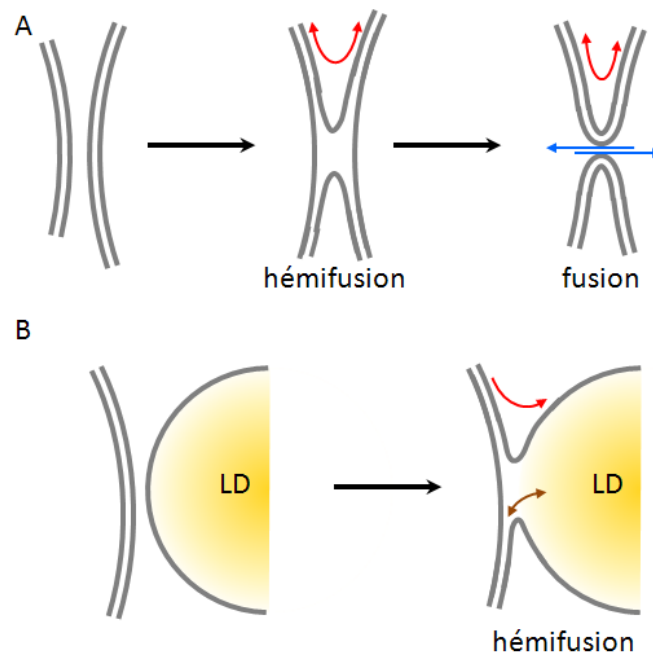


Figure 7-1 : Principe de la fusion membranaire entre deux bicouches (A) ou entre une bicouche et une gouttelette lipidique (B). (A) Lors de l'étape d'hémifusion, seuls les deux feuillets superficiels des bicouches sont fusionnés, permettant la diffusion des lipides entre les deux membranes. Lors de la fusion, la création d'un pore permet le passage des solutés entre les deux compartiments ; (B) Dans le cas des gouttelettes lipidiques, l'hémifusion permettrait la diffusion des phospholipides de la bicouche vers la monocouche et le passage de lipides neutres entre les deux feuillets.

Rôle de GBF1 dans la lipolyse

La lipolyse (mobilisation des acides gras contenus dans les gouttelettes lipidiques) est induite dans les adipocytes, en cas de carence, par des hormones. La lipase HSL (*hormone sensitive lipase*) était connue depuis longtemps pour être activée par la PKA en réponse à une stimulation hormonale. Cependant, les souris délétées pour HSL ne montrent pas d'accumulation de triacylglycérols et ne sont

pas obèses, ce qui implique qu'une autre lipase est nécessaire pour les premières étapes de la lipolyse.

L'expression d'ATGL est fortement induite lors de la différenciation des adipocytes et possède une activité triacylglycérol-lipase [372]. De plus, son expression est ubiquitaire et les souris délétées du gène de l'ATGL (*atgl*^{-/-}) présentent une obésité avec accumulation de triacylglycérols dans les adipocytes et les tissus. La lipolyse est donc réalisée par l'activité séquentielle de trois lipases :

- ATGL est la première lipase et catalyse l'hydrolyse du triacylglycérol en positions *sn*-2 ou *sn*-1 [373], [374],
- HSL est la diacylglycérol-lipase qui hydrolyse sélectivement les *sn*1,3 diacylglycérols,
- une monoacylglycérol lipase peut ensuite éventuellement hydrolyser le dernier acide gras pour libérer le glycérol.

L'activité triacylglycérol-lipase d'ATGL est fortement stimulée par l'interaction avec CGI-58. Or, en condition basale (sans stimulation hormonale de la lipolyse), CGI-58 est complexé avec PLIN-1 (Figure 7-2). Lors de la stimulation hormonale de la lipolyse, la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) est activée, ce qui permet de phosphoryler PLIN1 et HSL [375]. La phosphorylation de PLIN-1 permet d'une part de libérer CGI-58 qui peut activer ATGL [175], d'autre part de recruter HSL à la surface des gouttelettes lipidiques (Figure 7-2).

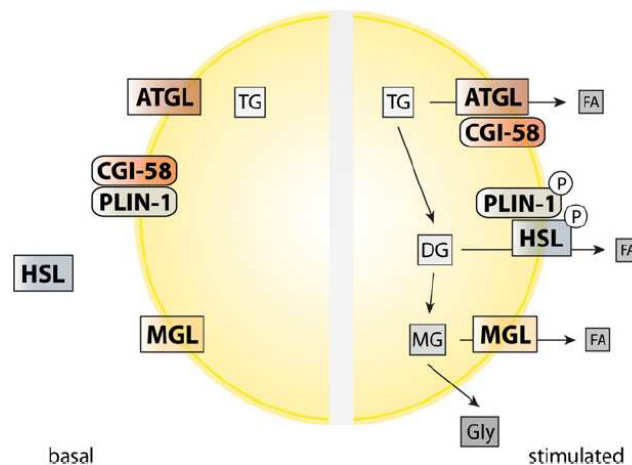


Figure 7-2 : lipolyse des gouttelettes lipidiques en condition basale (à gauche) et stimulée par les hormones (à droite) [175]. En condition basale, la lipolyse est faible en raison de l'association entre PLIN-1 et CGI-58. Lors de la stimulation hormonale de la lipolyse, la phosphorylation de PLIN-1 et de HSL induit la libération de CGI-58 qui active ATGL, et le recrutement de HSL sur la surface des gouttelettes par interaction avec PLIN-1.

Les signaux de lipolyse activent la kinase activée par l'AMP (AMPK) [376]. Or des travaux ont montré que la thréonine 1337 (Thr¹³³⁷) de GBF1 est phosphorylé par l'AMPK [377]. Cette phosphorylation induit une perte de la localisation membranaire de GBF1 et une diminution de l'activation de Arf1 [378] à l'origine de la fragmentation du Golgi lors de l'entrée en mitose [378], [379]. Ces données suggèrent que l'activité ou la localisation de GBF1 pourraient être régulées par phosphorylation.

Nos observations de la localisation de GBF1 autour des gouttelettes lipidiques dans les cellules HeLa ont été réalisées après une carence des cellules en acide gras suivit d'une induction de la formation des gouttelettes lipidiques par un traitement

à l'acide oléique. De même, dans un modèle d'adipocytes induits *in vitro*, GBF1 montre une localisation sur les gouttelettes lipidiques. La différenciation des adipocytes permet d'activer des voies de signalisation menant à l'expression de gènes cibles (en particulier ATGL).

Ces observations suggèrent une régulation de GBF1 par phosphorylation. L'AMPK activée par voie hormonale ou lors de la différenciation des adipocytes phosphoryle GBF1 sur la thréonine 1337. Ce résidu, situé après le domaine HDS2 pourrait permettre non pas une inhibition de l'activité GEF de GBF1 mais un changement de conformation permettant d'exposer les domaines HDS1 et HDS2 de fixation aux lipides. Cette fixation aux gouttelettes lipidiques de GBF1 permettrait ensuite de recruter la lipase ATGL à la surface des gouttelettes.

La capacité d'échange d'une interface est proportionnelle à sa surface. En particulier l'accessibilité des lipides neutres au cœur des gouttelettes lipidiques est d'autant plus grande que la surface des gouttelettes lipidiques est grande. Pour augmenter cette surface, l'une des solutions est d'augmenter le nombre de gouttelettes lipidiques. Or, sur une bicouche, GBF1 permet de recruter le manteau COPI permettant de former des vésicules.

Une hypothèse permettant d'augmenter l'efficacité de la lipolyse induite par une stimulation hormonale serait de former des petites gouttelettes lipidiques à partir d'une plus grosse grâce au recrutement du manteau COPI sur la monocouche. L'augmentation de la surface générée par la formation de petites gouttelettes lipidiques (≈ 60 nm de diamètre) induit, en outre, l'apparition de défauts de *packing* similaires à ceux observés sur des vésicules. Ces défauts de *packing* pourraient faciliter la localisation des lipases (comme ATGL) et l'accès aux triacylglycérols du cœur.

Récemment, la capacité de COPI à former des petites gouttelettes lipidiques à partir d'une interface triacylglycérol-phospholipide-eau a été montrée *in vitro* [380]. Les petites gouttelettes lipidiques ainsi générées sont fusogènes ce qui est expliqué par une diminution de la densité des phospholipides de la monocouche. Ainsi, une autre façon d'augmenter l'efficacité du recrutement des protéines sur la surface des gouttelettes lipidiques pourrait reposer sur une modulation de la tension de surface. COPI serait responsable de cette activation de la monocouche.

Des nouvelles fonctions de GBF1 ?

L'analyse de l'interactome présentée dans ce manuscrit indique que GBF1 possède un grand nombre de partenaires physiques. Ces observations confirment un crible du laboratoire en double hybride dans la levure avec GBF1 montrant aussi un grand nombre de partenaires potentiels. Ces deux études indépendantes, dans deux modèles différents, nous suggèrent que GBF1 possède de multiples partenaires.

Les partenaires impliqués dans le trafic vésiculaire sont attendus (COPI par exemple) et retrouvés. GBF1 posséderait aussi des liens avec d'autres voies de trafic vésiculaire rétrograde, notamment Rab1 (cascade entre Rab1 et Arf1 ?) et Rab6, indiquant que GBF1 pourrait avoir un rôle dans plusieurs voies. Nous avons aussi retrouvé des enzymes impliquées dans l'homéostasie des lipides (FAS par

exemple). Pour ces enzymes, l'interaction avec GBF1 peut être liée à un mécanisme similaire à ATGL de localisation auprès des gouttelettes lipidiques.

GBF1 posséderait aussi de nombreux partenaires mitochondriaux. Dans les deux analyses, des transporteurs localisés sur la membrane externe de la mitochondrie ont été mis en évidence. Ces transporteurs pourraient être des cargos contenus dans les vésicules COPI. Cependant, la fusion de vésicules avec la mitochondrie n'a pas été démontrée. Une autre hypothèse pourrait être liée à un rôle de GBF1 au niveau des sites de contact grâce aux nombreux domaines d'interaction et de localisation de la protéine. La possibilité de la présence de GBF1 au niveau des sites de contact entre les gouttelettes lipidiques et le réticulum ou le ERGIC est discutée plus haut. De la même façon, les résultats d'*interactomique* semblent indiquer que GBF1 pourrait avoir un rôle dans l'adressage de protéines vers les mitochondries. Un mécanisme dépendant des sites de contact pourrait être envisagé. Ainsi, la formation des sites de contact entre le réticulum et les mitochondries pourrait dépendre de la voie COPI [381]. Le protéome de ces sites de contact indique la présence de COPI et de Arf3 ainsi que des partenaires mitochondriaux de GBF1 (SLC25A3 par exemple) [382]. Rab1A, Rab1B, TMED10, sont retrouvés à la fois dans les sites de contact entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries et dans l'interactome de GBF1.

Enfin, GBF1 possède une localisation à la membrane plasmique, au niveau du lamellipode de la cellule (marqué par la cortactine). Des données récentes ont montré que GBF1 est recruté au lamellipode lors de la stimulation des GPCR, en réponse à un signal de chimiotactisme [358]. Ce recrutement est nécessaire pour induire le chimiotactisme de la cellule ; dont la voie de signalisation passerait par l'activation de Arf1 à la membrane plasmique. Une autre étude montre que GBF1 est requis pour une voie d'endocytose indépendante de la dynamine et de la clathrine (voie GEEC, *GPI-anchored proteins enriched early endosomal compartment*) [52]. De plus amples études seront nécessaires pour comprendre le rôle et la fonction de GBF1 au niveau de la membrane plasmique.

7.2 Vers un code des hélices amphipatiques ?

Les hélices amphipatiques peuvent discriminer les membranes selon leur composition

Mes résultats suggèrent que la fixation de GBF1 sur les membranes de la voie sécrétoire précoce repose sur l'insertion d'hélice amphipatique. Les expériences de biochimie menées au laboratoire n'ont pas pu montrer de spécificité du domaine HDS1 pour des lipides chargés (PI ou PS) pour la fixation sur les liposomes. Ces résultats suggèrent que la fixation de GBF1 sur les membranes ne repose pas uniquement sur une forte interaction électrostatique. Cette observation conforte l'hypothèse de deux territoires membranaires au sein de la cellule, dont la reconnaissance par les protéines périphériques est basée sur deux chimies différentes [383]. Les membranes en connexion avec la surface de la cellule

(membrane plasmique, TGN, endosomes) ont une composition riche en sphingomyéline et cholestérol. Elles présentent aussi des lipides chargés négativement (PS, PI et phosphoinositides). Les interactions électrostatiques sont une composante importante pour la fixation de protéines périphériques sur ces membranes [383].

Les membranes en connexion de la voie sécrétoire précoce (réticulum endoplasmique, *cis*-Golgi et ERGIC) présentent peu de lipides chargés, sont pauvres en cholestérol et en sphingomyéline. Ces membranes sont donc plus fines, plus lâches et plus facilement déformables. La fixation des protéines périphériques sur ces membranes repose sur la reconnaissance des défauts de *packing*. La position centrale du Golgi entre ces deux territoires en fait une organelle primordiale pour le contrôle et l'établissement de cette dichotomie ; grâce entre autres à un tri protéo-lipidique. Ces compositions lipidiques supportent des fonctions spécifiques :

- la membrane plasmique est résistante et imperméable pour former une barrière sélective efficace,
- le réticulum est souple et perméable ce qui facilite l'insertion de protéines et la translocation de lipides entre les deux feuillet.

Plusieurs stratégies peuvent être employées pour la localisation d'une protéine sur une membrane. En fonction des territoires membranaires (TGN/endosomes ou ER/Golgi), les moyens de localisation utilisés sont différents (Figure 7-3). En particulier, pour le territoire ER/Golgi, l'association aux membranes peut être liée à l'insertion d'une hélice amphipatique. L'hélice amphipatique est un bon motif de fixation sur une membrane peu chargée et désordonnée :

- insertion dans les poches hydrophobes permettant de stabiliser les défauts de *packing* ; ce qui permet de soulager une partie du stress de la membrane,
- structuration de l'hélice lors de l'insertion dans la membrane (motif ALPS) ; ce qui permet de ne pas exposer au cytosol des domaines hydrophobes de la protéine,
- insertion stabilisée par de nombreuses interactions faibles (hydrophobes avec les chaînes d'acide gras, électrostatiques avec le groupement phosphate et hydrogène avec le solvant) ; ce qui assure un ancrage stable de l'hélice.

Une hélice amphipatique interagit avec plusieurs parties des lipides membranaires (acides gras, phosphate et groupement polaire). *A priori*, l'hélice amphipatique sera donc sensible au contenu en acide gras de la membrane (ce qui n'est pas le cas par exemple de domaines de liaison aux phosphoinositides qui ne reconnaissent que le degré de phosphorylation du noyau inositol).

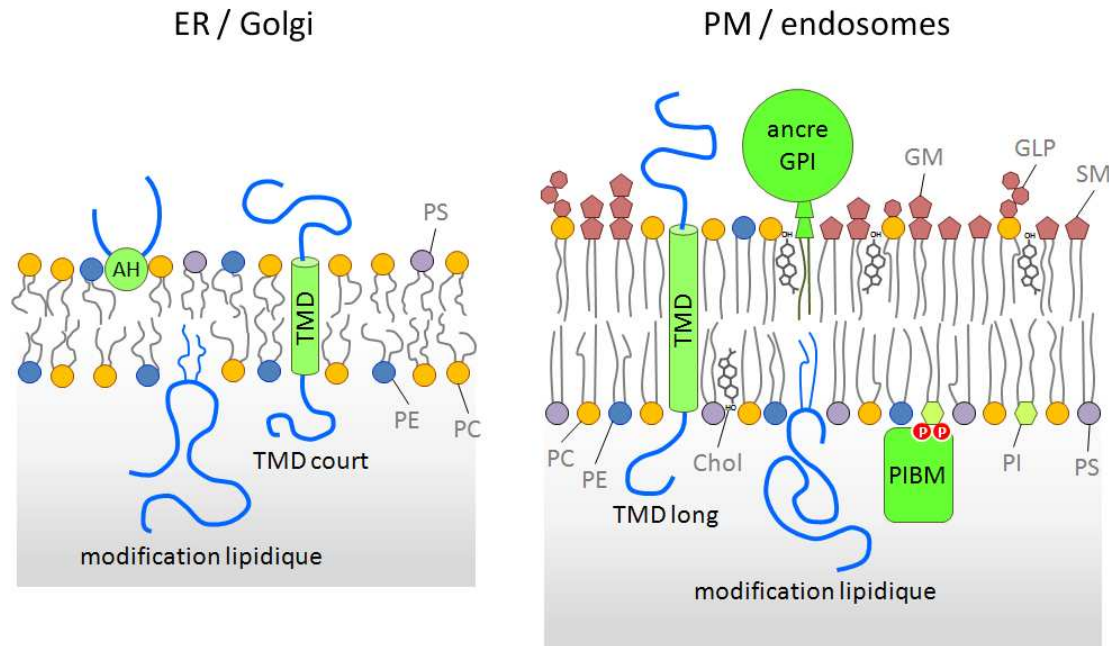


Figure 7-3 : Mécanismes de localisation des protéines sur les deux territoires membranaires. Le territoire ER/Golgi est favorable aux domaines transmembranaires courts et aux hélices amphipatiques. Le territoire PM/endosome est favorable aux TMD longs et aux ancres GPI. La présence de phosphoinositides permet l'utilisation de domaines de fixation spécifiques. Les modifications lipidiques permettant l'ancrage à la membrane sont possibles dans les deux territoires. TMD : domaine transmembranaire (*trans membrane domain*) ; GM : glycosphingolipides ; GLP : glycopospholipides ; SM : sphingolipides ; PIBM : *phosphoinositide binding domain* ; AH : hélice amphipatique ; PM : membrane plasmique ; PIBM : *phosphoinositides binding modules*.

Les senseurs de courbure sont des protéines se liant spécifiquement sur des membranes courbées (≈ 30 nm de diamètre). Les motifs BAR possèdent une structure rigide en forme de croissant [384]. Ils interagissent avec les membranes *via* des interactions électrostatiques entre les charges négatives de la membrane et les charges positives de la protéine [385], [386]. Ainsi, les domaines BAR interagissent préférentiellement avec les membranes chargées du territoire PM/endosome (enrichi en PS et PI).

Les motifs ALPS et α -synuclein sont des senseurs de courbure, *in vitro* et *in vivo* [383], [387]. Ces domaines se structurent en hélice amphipatique *non équilibrée*. Le motif ALPS possède une très large face hydrophobe et peu de charges dans la petite face polaire (Figure 7-4). Inversement, l' α -synuclein possède une face polaire bien développée avec de nombreuses charges (résidus chargés négativement à l'interface et résidus chargés positivement au centre de la face polaire) et une face hydrophobe comportant des résidus faiblement hydrophobes. Cette différence de structure permet de discriminer des défauts de *packing* dans des membranes de composition différente. La large face hydrophobe du domaine ALPS peut facilement être accommodée dans les membranes courbées du territoire ER/Golgi alors que les charges de l' α -synuclein permettent de stabiliser l'insertion de l'hélice dans les membranes courbées du territoire PM/endosome.

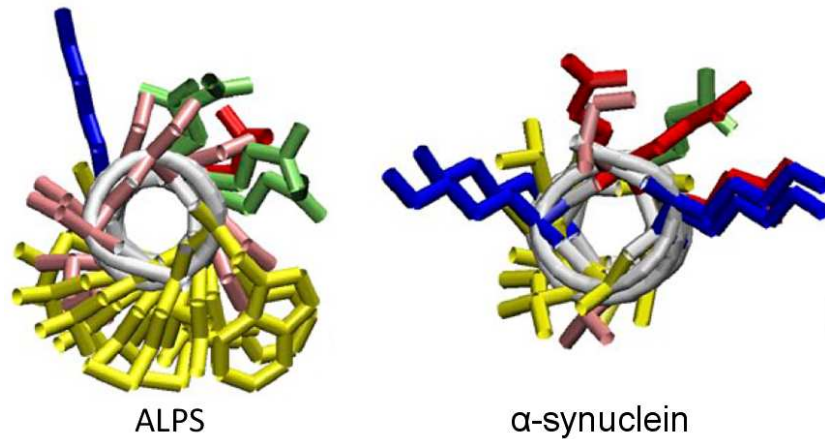


Figure 7-4 : Structure des senseurs de courbures ALPS et α -synuclein permettant de reconnaître des compositions membranaires différentes [387].

Une hélice spécifique des gouttelettes lipidiques ?

L'hélice amphipatique C-terminale du domaine HDS1 est suffisante pour localiser la GFP sur les gouttelettes lipidiques. Cependant, cette localisation n'est pas stricte et l'hélice peut aussi être localisée sur la bicouche du Golgi.

Les hélices amphipatiques sont utilisées pour la localisation de protéines à la surface des gouttelettes lipidiques [361], [362], [388]. En effet, la structure des gouttelettes lipidique interdit l'insertion de domaine transmembranaire. De même l'absence de lipide spécifique ne permet pas l'utilisation de domaine de liaison aux lipides (domaines PIBM par exemple) (Figure 7-5). L'insertion d'une protéine par modification lipidique n'a pas été documentée et l'insertion d'une structure en *épingle à cheveux* bien que probable n'a pas non plus été clairement montrée par une structure [231].

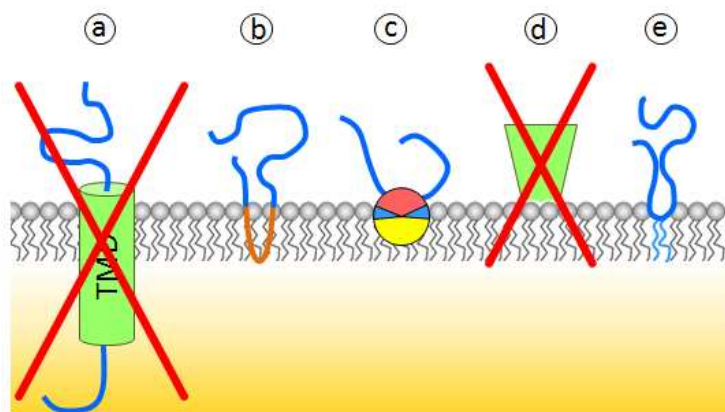


Figure 7-5 : Domaines possibles de fixation à la surface des gouttelettes lipidiques. (a) l'insertion d'un domaine transmembranaire (TMD) semble être *a priori* exclu ; (b) structure en épingle à cheveux (*hairpin*) ; (c) hélice amphipatique ; (d) la fixation par un domaine de reconnaissance du groupement polaire semble être exclu en raison de l'absence d'un phospholipide spécifique des gouttelettes ; (e) modification lipidique.

Cependant, la structure typique d'une hélice amphipatique permettant l'association aux gouttelettes lipidiques n'est pas encore élucidée. Aucune des hélices étudiées ne permet, seule, une association stable et stricte autour des gouttelettes lipidiques. La discrimination entre la surface des gouttelettes lipidiques et les membranes du réticulum n'est pas comprise. Pourtant, il existe clairement

une différence entre ces deux membranes car plusieurs analyses de FRAP de protéines associées aux gouttelettes lipidiques indiquent que l'association d'une protéine autour d'une gouttelette lipidique est stable [229]. Cette stabilité pourrait être expliquée en partie par des propriétés particulières de la monocouche des gouttelettes lipidiques, éventuellement influencées par les lipides neutres du cœur. La modulation de la tension de membranes par le système GBF1-Arf1-COPI sur les gouttelettes lipidiques pourrait être un nouveau mécanisme permettant l'insertion d'hélices amphipatiques dans la monocouche de phospholipides des gouttelettes lipidiques.

8Références

- [1] S. Nagotu, V. C. Kalel, R. Erdmann, and H. W. Platta, "Molecular basis of peroxisomal biogenesis disorders caused by defects in peroxisomal matrix protein import.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1822, no. 9, pp. 1326–36, Sep. 2012.
- [2] J. S. Bonifacino and B. S. Glick, "The mechanisms of vesicle budding and fusion.," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 153–66, Jan. 2004.
- [3] a Drösch, "The history of the Golgi apparatus in neurones from its discovery in 1898 to electron microscopy.," *Brain research bulletin*, vol. 47, no. 3, pp. 199–203, Oct. 1998.
- [4] A. J. DALTON and M. D. FELIX, "Cytologic and cytochemical characteristics of the Golgi substance of epithelial cells of the epididymis in situ, in homogenates and after isolation.," *The American journal of anatomy*, vol. 94, no. 2, pp. 171–207, Mar. 1954.
- [5] S. Emr, B. S. Glick, A. D. Linstedt, J. Lippincott-Schwartz, A. Luini, V. Malhotra, B. J. Marsh, A. Nakano, S. R. Pfeffer, C. Rabouille, J. E. Rothman, G. Warren, and F. T. Wieland, "Journeys through the Golgi-taking stock in a new era.," *The Journal of cell biology*, vol. 187, no. 4, pp. 449–53, Nov. 2009.
- [6] E. Martínez-Alonso, M. Tomás, and J. A. Martínez-Menárguez, "Morpho-functional architecture of the Golgi complex of neuroendocrine cells.," *Frontiers in endocrinology*, vol. 4, p. 41, Jan. 2013.
- [7] M. Sarkar, P. A. Leventis, C. I. Silvescu, V. N. Reinhold, H. Schachter, and G. L. Boulianne, "Null mutations in *Drosophila* N-acetylglucosaminyltransferase I produce defects in locomotion and a reduced life span.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 18, pp. 12776–85, May 2006.
- [8] P. Grasa, H. Kaune, and S. A. Williams, "Embryos generated from oocytes lacking complex N- and O-glycans have compromised development and implantation.," *Reproduction (Cambridge, England)*, vol. 144, no. 4, pp. 455–65, Oct. 2012.
- [9] E. Ioffe and P. Stanley, "Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 2, pp. 728–32, Jan. 1994.
- [10] a S. Opat, C. van Vliet, and P. a Gleeson, "Trafficking and localisation of resident Golgi glycosylation enzymes.," *Biochimie*, vol. 83, no. 8, pp. 763–73, Aug. 2001.
- [11] A. Luini, "A brief history of the cisternal progression-maturation model.," *Cellular logistics*, vol. 1, no. 1, pp. 6–11, Jan. 2011.
- [12] B. S. Glick, T. Elston, and G. Oster, "Hypothesis A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack," vol. 414, pp. 177–181, 1997.
- [13] A. Nakano and A. Luini, "Passage through the Golgi.," *Current opinion in cell biology*, vol. 22, no. 4, pp. 471–8, Aug. 2010.
- [14] G. H. Patterson, K. Hirschberg, R. S. Polishchuk, D. Gerlich, R. D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz, "Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system.," *Cell*, vol. 133, no. 6, pp. 1055–67, Jun. 2008.
- [15] E. Losev, C. a Reinke, J. Jellen, D. E. Strongin, B. J. Bevis, and B. S. Glick, "Golgi maturation visualized in living yeast.," *Nature*, vol. 441, no. 7096, pp. 1002–6, Jun. 2006.
- [16] A. M. Rojas, G. Fuentes, A. Rausell, and A. Valencia, "The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids.," *The Journal of cell biology*, vol. 196, no. 2, pp. 189–201, Jan. 2012.
- [17] R. Behnia and S. Munro, "Organelle identity and the signposts for membrane traffic.," *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 597–604, Dec. 2005.
- [18] F. a Barr, "Rab GTPase function in Golgi trafficking.," *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 20, no. 7, pp. 780–3, Sep. 2009.
- [19] R. a Kahn, J. Cherfils, M. Elias, R. C. Lovering, S. Munro, and A. Schurmann, "Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins.," *The Journal of cell biology*, vol. 172, no. 5, pp. 645–50, Feb. 2006.
- [20] J. G. Donaldson and C. L. Jackson, "Regulators and effectors of the ARF GTPases.," *Current opinion in cell biology*, vol. 12, no. 4, pp. 475–82, Aug. 2000.
- [21] D. Duijsings, K. H. W. Lanke, S. H. J. van Dooren, M. M. T. van Dommelen, R. Wetzels, F. de Mattia, E. Wessels, and F. J. M. van Kuppeveld, "Differential membrane association properties and regulation of class I and class II Arfs.," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 10, no. 3, pp. 316–23, Mar. 2009.
- [22] J. G. Donaldson and C. L. Jackson, "ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 12, no. 6, pp. 362–75, Jun. 2011.
- [23] J. Chun, Z. Shapovalova, S. Y. Dejgaard, J. F. Presley, and P. Melanc, "Characterization of Class I and II ADP-Ribosylation Factors (Arfs) in Live Cells□: GDP-bound Class II Arfs Associate with the

- ER-Golgi Intermediate Compartment Independently of GBF1," vol. 19, no. August, pp. 3488–3500, 2008.
- [24] O. Pellon-Cardenas, J. Clancy, H. Uwimpuhwe, and C. D'Souza-Schorey, "ARF6-regulated endocytosis of growth factor receptors links cadherin-based adhesion to canonical Wnt signaling in epithelia.," *Molecular and cellular biology*, no. May, May 2013.
- [25] J. K. Schweitzer, A. E. Sedgwick, and C. D'Souza-Schorey, "ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis.," *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 22, no. 1, pp. 39–47, Feb. 2011.
- [26] R. a Kahn, L. Volpicelli-Daley, B. Bowzard, P. Shrivastava-Ranjan, Y. Li, C. Zhou, and L. Cunningham, "Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics.," *Biochemical Society transactions*, vol. 33, no. Pt 6, pp. 1269–72, Dec. 2005.
- [27] P. Chavrier and J. Ménétreay, "Toward a structural understanding of arf family:effector specificity.," *Structure (London, England)*: 1993, vol. 18, no. 12, pp. 1552–8, Dec. 2010.
- [28] S. Pasqualato, J. Ménétreay, M. Franco, and J. Cherfils, "The structural GDP/GTP cycle of human Arf6.," *EMBO reports*, vol. 2, no. 3, pp. 234–8, Mar. 2001.
- [29] A. K. Gillingham and S. Munro, "The small G proteins of the Arf family and their regulators.," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 23, pp. 579–611, Jan. 2007.
- [30] C. L. Jackson and J. E. Casanova, "Turning on ARF: the Sec7 family of exchange factors," vol. 6, no. 99, pp. 60–67, 2000.
- [31] J. E. Casanova, "Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors.," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 8, no. 11, pp. 1476–85, Nov. 2007.
- [32] T. C. Cronin, J. P. DiNitto, M. P. Czech, and D. G. Lambright, "Structural determinants of phosphoinositide selectivity in splice variants of Grp1 family PH domains.," *The EMBO journal*, vol. 23, no. 19, pp. 3711–20, Oct. 2004.
- [33] X. Jian, J. M. Gruschus, E. Sztul, and P. a Randazzo, "The pleckstrin homology (PH) domain of the Arf exchange factor Brag2 is an allosteric binding site.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 29, pp. 24273–83, Jul. 2012.
- [34] M. Franco, P. J. Peters, J. Boretto, E. van Donselaar, a Neri, C. D'Souza-Schorey, and P. Chavrier, "EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization.," *The EMBO journal*, vol. 18, no. 6, pp. 1480–91, Mar. 1999.
- [35] E. Macia, M. Chabre, and M. Franco, "Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 27, pp. 24925–30, Jul. 2001.
- [36] R. D. Klausner, J. G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz, "Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure.," *The Journal of cell biology*, vol. 116, no. 5, pp. 1071–80, Mar. 1992.
- [37] K. Prydz, S. H. Hansen, K. Sandvig, and B. van Deurs, "Effects of brefeldin A on endocytosis, transcytosis and transport to the Golgi complex in polarized MDCK cells.," *The Journal of cell biology*, vol. 119, no. 2, pp. 259–72, Oct. 1992.
- [38] J. P. Vogel, J. N. Lee, D. R. Kirsch, M. D. Rose, and E. S. Sztul, "Brefeldin A causes a defect in secretion in *Saccharomyces cerevisiae*.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 5, pp. 3040–3, Feb. 1993.
- [39] J. G. Donaldson, D. Finazzi, and R. D. Klausner, "Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein.," *Nature*, vol. 360, no. 6402, pp. 350–2, Nov. 1992.
- [40] A. Peyroche, B. Antonny, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, and C. L. Jackson, "Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain.," *Molecular cell*, vol. 3, no. 3, pp. 275–85, Mar. 1999.
- [41] X. Zhao, T. K. R. Lasell, and P. Melanc, "Localization of Large ADP-Ribosylation Factor-Guanine Nucleotide Exchange Factors to Different Golgi Compartments: Evidence for Distinct Functions in Protein Traffic," vol. 13, no. January, pp. 119–133, 2002.
- [42] K. Kawamoto, Y. Yoshida, H. Tamaki, S. Torii, C. Shinotsuka, S. Yamashina, and K. Nakayama, "GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat.," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 3, no. 7, pp. 483–95, Jul. 2002.
- [43] R. García-Mata and E. Sztul, "The membrane-tethering protein p115 interacts with GBF1, an ARF guanine-nucleotide-exchange factor.," *EMBO reports*, vol. 4, no. 3, pp. 320–5, Mar. 2003.
- [44] B. Mouratou, V. Biou, A. Joubert, J. Cohen, D. J. Shields, N. Geldner, G. Jürgens, P. Melançon, and J. Cherfils, "The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein Arf.," *BMC genomics*, vol. 6, p. 20, Jan. 2005.
- [45] O. Ramaen, A. Joubert, P. Simister, N. Belgareh-Touzé, M. C. Olivares-Sanchez, J.-C. Zehe, S. Chantalat, M.-P. Golinelli-Cohen, C. L. Jackson, V. Biou, and J. Cherfils, "Interactions between conserved domains within homodimers in the BIG1, BIG2, and GBF1 Arf guanine nucleotide exchange factors.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 39, pp. 28834–42, Sep. 2007.
- [46] E. N. Ellong, K. G. Soni, Q.-T. Bui, R. Sougrat, M.-P. Golinelli-Cohen, and C. L. Jackson, "Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the Arf1

- activator GBF1.,” *PLoS one*, vol. 6, no. 7, p. e21889, Jan. 2011.
- [47] Y. Deng, M.-P. Golinelli-Cohen, E. Smirnova, and C. L. Jackson, “A COPI coat subunit interacts directly with an early-Golgi localized Arf exchange factor.,” *EMBO reports*, vol. 10, no. 1, pp. 58–64, Jan. 2009.
- [48] P. Monetta, I. Slavin, N. Romero, and C. Alvarez, “Rab1b Interacts with GBF1 and Modulates both ARF1 Dynamics and COPI Association □,” vol. 18, no. July, pp. 2400–2410, 2007.
- [49] A. Godi, P. Pertile, R. Meyers, P. Marra, G. Di Tullio, C. Iurisci, A. Luini, D. Corda, and M. a De Matteis, “ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex.,” *Nature cell biology*, vol. 1, no. 5, pp. 280–7, Sep. 1999.
- [50] T. R. Graham and C. G. Burd, “Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases.,” *Trends in cell biology*, vol. 21, no. 2, pp. 113–21, Feb. 2011.
- [51] K. G. Soni, G. a Mardones, R. Sougrat, E. Smirnova, C. L. Jackson, and J. S. Bonifacino, “Coatome-dependent protein delivery to lipid droplets.,” *Journal of cell science*, vol. 122, no. Pt 11, pp. 1834–41, Jun. 2009.
- [52] G. D. Gupta, M. G. Swetha, S. Kumari, R. Lakshminarayan, G. Dey, and S. Mayor, “Analysis of endocytic pathways in Drosophila cells reveals a conserved role for GBF1 in internalization via GEECs.,” *PLoS one*, vol. 4, no. 8, p. e6768, Jan. 2009.
- [53] K. H. W. Lanke, H. M. van der Schaar, G. a Belov, Q. Feng, D. Duijsings, C. L. Jackson, E. Ehrenfeld, and F. J. M. van Kuppeveld, “GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication.,” *Journal of virology*, vol. 83, no. 22, pp. 11940–9, Nov. 2009.
- [54] G. a Belov, Q. Feng, K. Nikovics, C. L. Jackson, and E. Ehrenfeld, “A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication.,” *PLoS pathogens*, vol. 4, no. 11, p. e1000216, Nov. 2008.
- [55] M. H. Verheije, M. Raaben, M. Mari, E. G. Te Lintelo, F. Reggiori, F. J. M. van Kuppeveld, P. J. M. Rottier, and C. a M. de Haan, “Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation.,” *PLoS pathogens*, vol. 4, no. 6, p. e1000088, Jun. 2008.
- [56] L. Goueslain, K. Alsaleh, P. Horellou, P. Roingard, V. Descamps, G. Duverlie, Y. Ciczora, C. Wyckowski, J. Dubuisson, and Y. Rouillé, “Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication.,” *Journal of virology*, vol. 84, no. 2, pp. 773–87, Jan. 2010.
- [57] F. Manolea, J. Chun, D. W. Chen, I. Clarke, N. Summerfeldt, J. B. Dacks, P. Melanc, and C. Tg, “Arf3 Is Activated Uniquely at the trans-Golgi Network by Brefeldin A-inhibited Guanine Nucleotide Exchange Factors,” vol. 21, pp. 1836–1849, 2010.
- [58] A. Eugster, G. Frigerio, M. Dale, and R. Duden, “COP I domains required for coatome integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP.,” *The EMBO journal*, vol. 19, no. 15, pp. 3905–17, Aug. 2000.
- [59] C. Austin, M. Boehm, and S. A. Tooze, “Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3.,” *Biochemistry*, vol. 41, no. 14, pp. 4669–77, Apr. 2002.
- [60] Y. Zhu, L. M. Traub, and S. Kornfeld, “ADP-ribosylation factor 1 transiently activates high-affinity adaptor protein complex AP-1 binding sites on Golgi membranes.,” *Molecular biology of the cell*, vol. 9, no. 6, pp. 1323–37, Jun. 1998.
- [61] X. Ren, G. G. Farías, B. J. Canagarajah, J. S. Bonifacino, and J. H. Hurley, “Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1.,” *Cell*, vol. 152, no. 4, pp. 755–67, Mar. 2013.
- [62] A. L. Boman, C. j Zhang, X. Zhu, and R. A. Kahn, “A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi.,” *Molecular biology of the cell*, vol. 11, no. 4, pp. 1241–55, Apr. 2000.
- [63] H. Takatsu, K. Yoshino, K. Toda, and K. Nakayama, “GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors.,” *The Biochemical journal*, vol. 365, no. Pt 2, pp. 369–78, Jul. 2002.
- [64] C. E. Ooi, E. C. Dell’Angelica, and J. S. Bonifacino, “ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes.,” *The Journal of cell biology*, vol. 142, no. 2, pp. 391–402, Jul. 1998.
- [65] M. Boehm, R. C. Aguilar, and J. S. Bonifacino, “Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs).” *The EMBO journal*, vol. 20, no. 22, pp. 6265–76, Nov. 2001.
- [66] M. a De Matteis and a Godi, “Protein-lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex.,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1666, no. 1–2, pp. 264–74, Nov. 2004.
- [67] A. Godi, A. Di Campli, A. Konstantakopoulos, G. Di Tullio, D. R. Alessi, G. S. Kular, T. Daniele, P. Marra, J. M. Lucocq, and M. A. De Matteis, “FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P.,” *Nature cell biology*, vol. 6, no. 5, pp. 393–404, May 2004.
- [68] J. He, J. L. Scott, A. Heroux, S. Roy, M. Lenoir, M. Overduin, R. V. Stahelin, and T. G. Kutateladze, “Molecular basis of phosphatidylinositol 4-phosphate and ARF1 GTPase recognition by the FAPP1 pleckstrin homology (PH) domain.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 21, pp. 18650–7, May 2011.
- [69] M. a Olayioye and A. Hausser, “Integration of non-vesicular and vesicular transport processes at

- the Golgi complex by the PKD-CERT network.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1821, no. 8, pp. 1096–103, Aug. 2012.
- [70] H.-W. Shin and K. Nakayama, "Dual control of membrane targeting by PtdIns(4)P and ARF.," *Trends in biochemical sciences*, vol. 29, no. 10, pp. 513–5, Oct. 2004.
- [71] A. Skippen, D. H. Jones, C. P. Morgan, M. Li, and S. Cockcroft, "Mechanism of ADP ribosylation factor-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in HL60 cells.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 8, pp. 5823–31, Feb. 2002.
- [72] A. Martin, F. D. Brown, M. N. Hodgkin, A. J. Bradwell, S. J. Cook, M. Hart, and M. J. Wakelam, "Activation of phospholipase D and phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in HL60 membranes is mediated by endogenous Arf but not Rho.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 29, pp. 17397–403, Jul. 1996.
- [73] D. H. Jones, J. B. Morris, C. P. Morgan, H. Kondo, R. F. Irvine, and S. Cockcroft, "Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 18, pp. 13962–6, May 2000.
- [74] J. Whatmore, C. P. Morgan, E. Cunningham, K. S. Collison, K. R. Willison, and S. Cockcroft, "ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D activity is localized at the plasma membrane and intracellular organelles in HL60 cells.," *The Biochemical journal*, vol. 320 (Pt 3, pp. 785–94, Dec. 1996.
- [75] J. H. Kim, S. D. Lee, J. M. Han, T. G. Lee, Y. Kim, J. B. Park, J. D. Lambeth, P. G. Suh, and S. H. Ryu, "Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA.," *FEBS letters*, vol. 430, no. 3, pp. 231–5, Jul. 1998.
- [76] A. K. Gillingham, A. H. Y. Tong, C. Boone, and S. Munro, "The GTPase Arf1p and the ER to Golgi cargo receptor Erv14p cooperate to recruit the golgin Rud3p to the cis-Golgi.," *The Journal of cell biology*, vol. 167, no. 2, pp. 281–92, Oct. 2004.
- [77] J. Cardenas, S. Rivero, B. Goud, M. Bornens, and R. M. Rios, "Golgi localisation of GMAP210 requires two distinct cis-membrane binding mechanisms.," *BMC biology*, vol. 7, p. 56, Jan. 2009.
- [78] M. Zerial and H. McBride, "Rab proteins as membrane organizers.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 2, no. 2, pp. 107–17, Mar. 2001.
- [79] A. Barnekow, A. Thyrock, and D. Kessler, "Chapter 5: rab proteins and their interaction partners.," *International review of cell and molecular biology*, vol. 274, no. 08, pp. 235–74, Jan. 2009.
- [80] Y. Diekmann, E. Seixas, M. Gouw, F. Tavares-Cadete, M. C. Seabra, and J. B. Pereira-Leal, "Thousands of rab GTPases for the cell biologist.," *PLoS computational biology*, vol. 7, no. 10, p. e1002217, Oct. 2011.
- [81] E. J. Chenette and C. J. Der, *Lipid Modification of Ras Superfamily GTPases*: Not Just Membrane Glue, 1st ed., vol. 29. Elsevier Inc., 2011, pp. 59–95.
- [82] H. Stenmark, "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 10, no. 8, pp. 513–25, Aug. 2009.
- [83] O. Martinez and B. Goud, "Rab proteins.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1404, no. 1–2, pp. 101–12, Aug. 1998.
- [84] A. H. Hutagalung and P. J. Novick, "Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology," pp. 119–149, 2011.
- [85] S. R. Pfeffer, "Rab GTPase regulation of membrane identity.," *Current opinion in cell biology*, Apr. 2013.
- [86] B. L. Grosshans, D. Ortiz, and P. Novick, "Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 32, pp. 11821–7, Aug. 2006.
- [87] J. Blümer, J. Rey, L. Dehmelt, T. Mazel, Y.-W. Wu, P. Bastiaens, R. S. Goody, and A. Itzen, "RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting.," *The Journal of cell biology*, vol. 200, no. 3, pp. 287–300, Feb. 2013.
- [88] F. Barr and D. G. Lambright, "Rab GEFs and GAPs.," *Current opinion in cell biology*, vol. 22, no. 4, pp. 461–70, Aug. 2010.
- [89] P. Barbero, L. Bittova, and S. R. Pfeffer, "Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells.," *The Journal of cell biology*, vol. 156, no. 3, pp. 511–8, Feb. 2002.
- [90] A. Echard, A. El Marjou, and B. Goud, "Expression, Purification, and Biochemical Properties of Rabkinesin-6 Domains and Their Interactions with Rab6A," *METHODS IN ENZYMOLOGY*, vol. 329, pp. 157–165, 2001.
- [91] E. Del Nery, S. Miserey-Lenkei, T. Falguières, C. Nizak, L. Johannes, F. Perez, and B. Goud, "Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking.," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 7, no. 4, pp. 394–407, Apr. 2006.
- [92] B. Short, C. Preisinger, J. Schaletzky, R. Kopajtich, and F. a Barr, "The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes.," *Current biology*: CB, vol. 12, no. 20, pp. 1792–5, Oct. 2002.
- [93] A. Echard, F. Jollivet, O. Martinez, J. J. Lacapère, A. Rousselet, I. Janoueix-Lerosey, and B. Goud, "Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 279, no. 5350, pp. 580–5, Jan. 1998.
- [94] S. Miserey-Lenkei, G. Chalancon, S. Bardin, E. Formstecher, B. Goud, and a Echard, "Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex.," *Nature cell biology*, vol. 12, no. 7, pp. 645–54, Jul. 2010.

- [95] C. Alvarez, H. Fujita, a Hubbard, and E. Sztul, "ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage.," *The Journal of cell biology*, vol. 147, no. 6, pp. 1205–22, Dec. 1999.
- [96] B. B. Allan, "Rab1 Recruitment of p115 into a cis-SNARE Complex: Programming Budding COPII Vesicles for Fusion," *Science*, vol. 289, no. 5478, pp. 444–448, Jul. 2000.
- [97] B. D. Moyer, B. B. Allan, and W. E. Balch, "Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering.," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 2, no. 4, pp. 268–76, Apr. 2001.
- [98] T. Weide, M. Bayer, M. Köster, J. P. Siebrasse, R. Peters, and A. Barnekow, "The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b.," *EMBO reports*, vol. 2, no. 4, pp. 336–41, Apr. 2001.
- [99] I. a García, H. E. Martinez, and C. Alvarez, "Rab1b regulates COPI and COPII dynamics in mammalian cells.," *Cellular logistics*, vol. 1, no. 4, pp. 159–163, Jan. 2011.
- [100] N. Epp, R. Rethmeier, L. Krämer, and C. Ungermann, "Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs.," *European journal of cell biology*, vol. 90, no. 9, pp. 779–85, Sep. 2011.
- [101] E. Mizuno-Yamasaki, F. Rivera-Molina, and P. Novick, "GTPase networks in membrane traffic.," *Annual review of biochemistry*, vol. 81, pp. 637–59, Jan. 2012.
- [102] D. Ortiz, M. Medkova, C. Walch-solimena, and P. Novick, "Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast," *Journal of Cell Biology*, vol. 157, no. 6, pp. 1005–1015, 2002.
- [103] T. Starr, Y. Sun, N. Wilkins, and B. Storrie, "Rab33b and Rab6 are functionally overlapping regulators of Golgi homeostasis and trafficking.," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 11, no. 5, pp. 626–36, May 2010.
- [104] G. V Pusapati, G. Luchetti, and S. R. Pfeffer, "Ric1-Rgp1 complex is a guanine nucleotide exchange factor for the late Golgi Rab6A GTPase and an effector of the medial Golgi Rab33B GTPase.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 50, pp. 42129–37, Dec. 2012.
- [105] H. Cai, S. Yu, S. Menon, Y. Cai, D. Lazarova, C. Fu, K. Reinisch, J. C. Hay, and S. Ferro-Novick, "TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23.," *Nature*, vol. 445, no. 7130, pp. 941–4, Feb. 2007.
- [106] C. Lord, D. Bhandari, S. Menon, M. Ghassemian, D. Nycz, J. Hay, P. Ghosh, and S. Ferro-Novick, "Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic.," *Nature*, vol. 473, no. 7346, pp. 181–6, May 2011.
- [107] A. L. Williams, S. Ehm, N. C. Jacobson, D. Xu, and J. C. Hay, "rsly1 binding to syntaxin 5 is required for endoplasmic reticulum-to-Golgi transport but does not promote SNARE motif accessibility.," *Molecular biology of the cell*, vol. 15, no. 1, pp. 162–75, Jan. 2004.
- [108] D. Xu and J. C. Hay, "Reconstitution of COPII vesicle fusion to generate a pre-Golgi intermediate compartment.," *The Journal of cell biology*, vol. 167, no. 6, pp. 997–1003, Dec. 2004.
- [109] F. Baschieri and H. Farhan, "Crosstalk of small GTPases at the Golgi apparatus Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute .," vol. 3, no. 2, pp. 80–90, 2012.
- [110] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification.," *Canadian journal of biochemistry and physiology*, vol. 37, no. 8, pp. 911–7, Aug. 1959.
- [111] M. Sud, E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E. A. Dennis, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, and S. Subramaniam, "LMSD: LIPID MAPS structure database.," *Nucleic acids research*, vol. 35, no. Database issue, pp. D527–32, Jan. 2007.
- [112] E. J. Dufourc, "Sterols and membrane dynamics.," *Journal of chemical biology*, vol. 1, no. 1–4, pp. 63–77, Nov. 2008.
- [113] G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, "Membrane lipids: where they are and how they behave.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 9, no. 2, pp. 112–24, Feb. 2008.
- [114] R. A. Coleman and D. G. Mashek, "Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling.," *Chemical reviews*, vol. 111, no. 10, pp. 6359–86, Oct. 2011.
- [115] V. a Zammit, "Hepatic triacylglycerol synthesis and secretion: DGAT2 as the link between glycaemia and triglyceridaemia.," *The Biochemical journal*, vol. 451, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2013.
- [116] Q. Liu, R. M. P. Siloto, R. Lehner, S. J. Stone, and R. J. Weselake, "Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology.," *Progress in lipid research*, vol. 51, no. 4, pp. 350–77, Oct. 2012.
- [117] S. J. Stone, H. M. Myers, S. M. Watkins, B. E. Brown, K. R. Feingold, P. M. Elias, and R. V Farese, "Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 12, pp. 11767–76, Mar. 2004.
- [118] H. R. Wurie, L. Buckett, and V. a Zammit, "Evidence that diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) has dual membrane topology in the endoplasmic reticulum of HepG2 cells.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 42, pp. 36238–47, Oct. 2011.
- [119] Q. Liu, R. M. P. Siloto, C. L. Snyder, and R. J. Weselake, "Functional and topological analysis of yeast acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2, an endoplasmic reticulum enzyme essential for triacylglycerol biosynthesis.," *The Journal of*

- biological chemistry*, vol. 286, no. 15, pp. 13115–26, Apr. 2011.
- [120] S. T. Pruett, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C. a Haynes, M. C. Sullards, D. C. Liotta, and A. H. Merrill, "Biodiversity of sphingoid bases ('sphingosines') and related amino alcohols.," *Journal of lipid research*, vol. 49, no. 8, pp. 1621–39, Aug. 2008.
- [121] Y. a Hannun and L. M. Obeid, "Many ceramides.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 32, pp. 27855–62, Aug. 2011.
- [122] C. R. Gault, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, "An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown," *Adv Exp Med Biol.*, vol. 688, pp. 1–23, 2010.
- [123] J. C. Holthuis, T. Pomorski, R. J. Raggars, H. Sprong, and G. Van Meer, "The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport.," *Physiological reviews*, vol. 81, no. 4, pp. 1689–723, Oct. 2001.
- [124] L. Svennerholm, "The Gangliosides," *Journal of lipid research*, vol. 5, pp. 145–55, Apr. 1964.
- [125] A. E. Cremesti, F. M. Goni, and R. Kolesnick, "Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome?," *FEBS letters*, vol. 531, no. 1, pp. 47–53, Oct. 2002.
- [126] D. K. Perry and Y. a Hannun, "The role of ceramide in cell signaling.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1436, no. 1–2, pp. 233–43, Dec. 1998.
- [127] S. J. Singer and G. L. Nicolson, "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 175, no. 4023, pp. 720–31, Feb. 1972.
- [128] L. a Bagatolli, J. H. Ipsen, A. C. Simonsen, and O. G. Mouritsen, "An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes.," *Progress in lipid research*, vol. 49, no. 4, pp. 378–89, Oct. 2010.
- [129] O. G. Mouritsen and M. Bloom, "Mattress model of lipid-protein interactions in membranes.," *Biophysical journal*, vol. 46, no. 2, pp. 141–53, Aug. 1984.
- [130] P. Somerharju, J. a Virtanen, and K. H. Cheng, "Lateral organisation of membrane lipids. The superlattice view.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1440, no. 1, pp. 32–48, Aug. 1999.
- [131] O. G. Mouritsen, *Life - As a Matter of Fat - The Emerging Science of Lipidomics*. Springer, 2005, p. 276.
- [132] G. Lindblom and G. Orädd, "Lipid lateral diffusion and membrane heterogeneity.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1788, no. 1, pp. 234–44, Jan. 2009.
- [133] F.-X. Contreras, L. Sánchez-Magraner, A. Alonso, and F. M. Goñi, "Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes.," *FEBS letters*, vol. 584, no. 9, pp. 1779–86, May 2010.
- [134] S. Cribier, G. Morrot, and A. Zachowski, "Dynamics of the Membrane Lipid Phase," *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, vol. 48, pp. 27–32, 1993.
- [135] T. K. Bjarnadóttir, D. E. Gloriam, S. H. Hellstrand, H. Kristiansson, R. Fredriksson, and H. B. Schiöth, "Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse.," *Genomics*, vol. 88, no. 3, pp. 263–73, Sep. 2006.
- [136] S. M. Foord, "Receptor classification: post genome.," *Current opinion in pharmacology*, vol. 2, no. 5, pp. 561–6, Oct. 2002.
- [137] Z.-U. Rehman, M. T. Mirza, A. Khan, and H. Xhaard, *Predicting G-protein-coupled receptors families using different physicochemical properties and pseudo amino acid composition.*, 1st ed., vol. 522. Elsevier Inc., 2013, pp. 61–79.
- [138] a J. Venkatakrisnan, X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler, and M. M. Babu, "Molecular signatures of G-protein-coupled receptors.," *Nature*, vol. 494, no. 7436, pp. 185–94, Feb. 2013.
- [139] X. Deupi and J. Standfuss, "Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors.," *Current opinion in structural biology*, vol. 21, no. 4, pp. 541–51, Aug. 2011.
- [140] S. Bhattacharya, S. E. Hall, H. Li, and N. Vaidehi, "Ligand-stabilized conformational states of human beta(2) adrenergic receptor: insight into G-protein-coupled receptor activation.," *Biophysical journal*, vol. 94, no. 6, pp. 2027–42, Mar. 2008.
- [141] A. D. Goddard and A. Watts, "Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol.," *BMC biology*, vol. 10, p. 27, Jan. 2012.
- [142] C. A. Boguth, P. Singh, C. Huang, and J. J. G. Tesmer, "Molecular basis for activation of G protein-coupled receptor kinases.," *The EMBO journal*, vol. 29, no. 19, pp. 3249–59, Oct. 2010.
- [143] K. T. Homan, A. Glukhova, and J. J. G. Tesmer, "Regulation of G protein-coupled receptor kinases by phospholipids.," *Current medicinal chemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 39–46, Jan. 2013.
- [144] J. Zanghellini, F. Wodlei, and H. H. von Grünberg, "Phospholipid demixing and the birth of a lipid droplet.," *Journal of theoretical biology*, vol. 264, no. 3, pp. 952–61, Jun. 2010.
- [145] K. F. Leung, R. Baron, and M. C. Seabra, "Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases.," *Journal of lipid research*, vol. 47, no. 3, pp. 467–75, Mar. 2006.
- [146] H. Zhang, R. Constantine, J. M. Frederick, and W. Baehr, "The prenyl-binding protein PrBP/δ: a chaperone participating in intracellular trafficking.," *Vision research*, vol. 75, pp. 19–25, Dec. 2012.
- [147] T. Kinoshita, M. Fujita, and Y. Maeda, "Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent

- progress.,” *Journal of biochemistry*, vol. 144, no. 3, pp. 287–94, Sep. 2008.
- [148] M. Fujita and T. Kinoshita, “GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1821, no. 8, pp. 1050–8, Aug. 2012.
- [149] R. Gautier, D. Douguet, B. Antonny, and G. Drin, “HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties,” *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 24, no. 18, pp. 2101–2, Sep. 2008.
- [150] S. Vanni, L. Vamparys, R. Gautier, G. Drin, C. Etchebest, P. F. J. Fuchs, and B. Antonny, “Amphipathic lipid packing sensor motifs: probing bilayer defects with hydrophobic residues,” *Biophysical journal*, vol. 104, no. 3, pp. 575–84, Feb. 2013.
- [151] A. R. Honerkamp-Smith, S. L. Veatch, and S. L. Keller, “An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1788, no. 1, pp. 53–63, Jan. 2009.
- [152] D. a Brown, “Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals,” *Physiology (Bethesda, Md.)*, vol. 21, pp. 430–9, Dec. 2006.
- [153] S. Sonnino and a Prinetti, “Membrane domains and the ‘lipid raft’ concept,” *Current medicinal chemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 4–21, Jan. 2013.
- [154] J. Ohlroggeav and J. Browseb, “Lipid Biosynthesis,” vol. 7, no. July, pp. 957–970, 1995.
- [155] Y. C. Kim and J. M. Ntambi, “Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 266, no. 1, pp. 1–4, Dec. 1999.
- [156] H. G. Enoch, A. Catala, and P. Strittmatter, “Mechanism of Rat Liver Microsomal Stearyl-CoA Desaturase, Studier of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 251, no. 16, pp. 5095–5103, 1976.
- [157] D. Meesapyodsuk and X. Qiu, “The front-end desaturase: structure, function, evolution and biotechnological use,” *Lipids*, vol. 47, no. 3, pp. 227–37, Mar. 2012.
- [158] H. P. Cho, “Cloning, Expression, and Fatty Acid Regulation of the Human Delta -5 Desaturase,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 52, pp. 471–477, Dec. 1999.
- [159] H. P. Cho, “Cloning, Expression, and Nutritional Regulation of the Mammalian Delta -6 Desaturase,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 1, pp. 471–477, Jan. 1999.
- [160] F. Domergue, A. Abbadi, C. Ott, T. K. Zank, U. Zähringer, and E. Heinz, “Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 37, pp. 35115–26, Sep. 2003.
- [161] M. T. Nakamura, H. P. Cho, J. Xu, Z. Tang, and S. D. Clarke, “Metabolism and functions of highly unsaturated fatty acids: an update,” *Lipids*, vol. 36, no. 9, pp. 961–4, Sep. 2001.
- [162] H. Chen, Z. Gu, H. Zhang, M. Wang, W. Chen, W. T. Lowther, and Y. Q. Chen, “Expression and purification of integral membrane fatty acid desaturases,” *PloS one*, vol. 8, no. 3, p. e58139, Jan. 2013.
- [163] J. Okuley, J. Lightner, K. Feldmann, N. Yadav, E. Lark, and J. Browse, “Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis,” *The Plant cell*, vol. 6, no. 1, pp. 147–58, Jan. 1994.
- [164] Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson, M. X. Andersson, V. Arondel, P. D. Bates, S. Baud, D. Bird, A. Debono, T. P. Durrett, R. B. Franke, I. a Graham, K. Katayama, A. a Kelly, T. Larson, J. E. Markham, M. Miquel, I. Molina, I. Nishida, O. Rowland, L. Samuels, K. M. Schmid, H. Wada, R. Welti, C. Xu, R. Zallot, and J. Ohlrogge, “Acyl-lipid metabolism,” *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, vol. 11, p. e0161, Jan. 2013.
- [165] J. Browse, M. Mcconns, D. James, T. Jr, and M. Miquels, “Mutants of Arabidopsis Deficient in the Synthesis of a-Linolenate,” no. 22, pp. 16345–16351, 1993.
- [166] J. a Napier, L. V Michaelson, and O. Sayanova, “The role of cytochrome b5 fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids,” *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, vol. 68, no. 2, pp. 135–43, Feb. 2003.
- [167] J. M. Ellis, J. L. Frahm, L. O. Li, and R. A. Coleman, “Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control,” *Current opinion in lipidology*, vol. 21, no. 3, pp. 212–7, Jun. 2010.
- [168] P. A. Watkins and J. M. Ellis, “Peroxisomal acyl-CoA synthetases,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1822, no. 9, pp. 1411–20, Sep. 2012.
- [169] J. Iqbal and M. M. Hussain, “Intestinal lipid absorption,” *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 296, no. 6, pp. E1183–94, Jun. 2009.
- [170] A. B. Thomson, C. Schoeller, M. Keelan, L. Smith, and M. T. Clandinin, “Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond,” *Canadian journal of physiology and pharmacology*, vol. 71, no. 8, pp. 531–55, Aug. 1993.
- [171] P. Tso and J. A. Balint, “Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics,” *The American journal of physiology*, vol. 250, no. 6 Pt 1, pp. G715–26, Jun. 1986.
- [172] M. C. Williams, A. P. Bateman, G. K. Jackson, and P. Yaqoob, “Dietary fatty acids and chylomicron synthesis and secretion,” *Biochemical Society transactions*, vol. 32, no. Pt 1, pp. 55–58, 2004.

- [173] S. Siddiqi and C. M. Mansbach, "Phosphorylation of Sar1b protein releases liver fatty acid-binding protein from multiprotein complex in intestinal cytosol enabling it to bind to endoplasmic reticulum (ER) and bud the pre-chylomicron transport vesicle.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 13, pp. 10178–88, Mar. 2012.
- [174] J. Vukmirica, K. Tran, X. Liang, J. Shan, J. Yuan, B. A. Miskie, R. A. Hegele, M. D. Resh, and Z. Yao, "Assembly and secretion of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B48 in transfected McA-RH7777 cells. Lack of evidence that palmitoylation of apolipoprotein B48 is required for lipoprotein secretion.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 16, pp. 14153–61, Apr. 2003.
- [175] S. G. Young and R. Zechner, "Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis.," *Genes & development*, vol. 27, no. 5, pp. 459–84, Mar. 2013.
- [176] S. Chung, J. M. Timmins, M. Duong, C. Degirolamo, S. Rong, J. K. Sawyer, R. R. Singaraja, M. R. Hayden, N. Maeda, L. L. Rudel, G. S. Shelness, and J. S. Parks, "Targeted deletion of hepatocyte ABCA1 leads to very low density lipoprotein triglyceride overproduction and low density lipoprotein hypercatabolism.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 16, pp. 12197–209, Apr. 2010.
- [177] K. Nyyssönen, S. Kurl, J. Karppi, T. Nurmi, D. Baldassarre, F. Veglia, R. Rauramaa, U. de Faire, A. Hamsten, A. J. Smit, E. Mannarino, S. E. Humphries, P. Giral, E. Grossi, and E. Tremoli, "LDL oxidative modification and carotid atherosclerosis: results of a multicenter study.," *Atherosclerosis*, vol. 225, no. 1, pp. 231–6, Nov. 2012.
- [178] T. Aoki, T. Abe, E. Yamada, T. Matsuto, and M. Okada, "Increased LDL susceptibility to oxidation accelerates future carotid artery atherosclerosis.," *Lipids in health and disease*, vol. 11, p. 4, Jan. 2012.
- [179] J.-H. Chen, C.-W. Tsai, C.-P. Wang, and H.-H. Lin, "Anti-atherosclerotic potential of gossypetin via inhibiting LDL oxidation and foam cell formation.," *Toxicology and applied pharmacology*, Jul. 2013.
- [180] X. Yu, Y. Fu, D.-W. Zhang, K. Yin, and C. Tang, "Foam cells in atherosclerosis," *Clinica Chimica Acta*, vol. 424C, pp. 245–252, Jun. 2013.
- [181] S. Tiwari and S. a Siddiqi, "Intracellular trafficking and secretion of VLDL.," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 32, no. 5, pp. 1079–86, May 2012.
- [182] A. Kulinski, S. Rustaeus, and J. E. Vance, "Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with ApoB, as well as for ApoB lipidation.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 35, pp. 31516–25, Aug. 2002.
- [183] M. Sundaram and Z. Yao, "Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion.," *Nutrition & metabolism*, vol. 7, p. 35, Jan. 2010.
- [184] A. Rahim, E. Nafi-valencia, S. Siddiqi, R. Basha, C. C. Runyon, and S. a Siddiqi, "Proteomic Analysis of the Very Low Density Lipoprotein (VLDL) Transport Vesicles," *J Proteomics*, vol. 75, no. 7, pp. 2225–2235, 2012.
- [185] K. Tran, G. Thorne-Tjomsland, C. J. DeLong, Z. Cui, J. Shan, L. Burton, J. C. Jamieson, and Z. Yao, "Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hepatoma McA-RH7777 cells.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 34, pp. 31187–200, Aug. 2002.
- [186] J. A. Higgins, "Evidence that during very low density lipoprotein assembly in rat hepatocytes most of the triacylglycerol and phospholipid are packaged with apolipoprotein B in the Golgi complex.," *FEBS letters*, vol. 232, no. 2, pp. 405–8, May 1988.
- [187] Foreign Agriculture Service/USDA, "Oilseeds: World Markets and Trade," 2013.
- [188] J. Baffes, R. Chaudhry, A. Gruère, V. Kelly, P. Labaste, S. Mink, and A. Plasti-, "Marchés des sous-produits du coton: Tendances mondiales et implications pour les producteurs Africains de coton," 2010.
- [189] M. I. Gurr, J. L. Harwood, and K. N. Frayn, *Lipid Biochemistry*, Fifth. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2002, p. 320.
- [190] B. Rouyer, C. Greenhalgh, C. Karsenti, and V. Pilet, *L'économie laitière en chiffres, édition 2013*. 2013, p. 184.
- [191] G. Beisson and V. Martinez, "Spécification technique n° E6-07 du 4 mai 2007 applicable aux matières grasses tartinables (beurres, margarines, etc.), aux matières grasses laitières ayant un taux de matière grasse égal ou supérieur à 90%, et aux préparations liquides à base de matières," 2007.
- [192] F. D. Gunstone, "Palm oil," *Lipid Technology*, vol. 24, no. 8, pp. 192–192, Aug. 2012.
- [193] FFAS, "L'huile de palme aspects nutritionnels, sociaux et environnementaux," 2011.
- [194] RSPO, "Principes et critères pour la production durable d'huile de palme," 2007.
- [195] A. Erkkilä, V. D. F. de Mello, U. Risérus, and D. E. Laaksonen, "Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach.," *Progress in lipid research*, vol. 47, no. 3, pp. 172–87, May 2008.
- [196] OMS, "Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air: particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre Mise à jour mondiale 2005 Synthèse de l'évaluation des risques," 2005.
- [197] ADEME, "Les Biocarburants de 1ère génération," 2011.
- [198] G. Knothe, "Will biodiesel derived from algal oils live up to its promise? A fuel property assessment," *Lipid Technology*, vol. 23, no. 11, pp. 247–249, Nov. 2011.

- [199] A. S. Carlsson, J. L. Yilmaz, A. G. Green, S. Stymne, and P. Hofvander, "Replacing fossil oil with fresh oil - with what and for what?," *European journal of lipid science and technology* □: *EJLST*, vol. 113, no. 7, pp. 812–831, Jul. 2011.
- [200] M. a. R. Meier, J. O. Metzger, and U. S. Schubert, "Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science," *Chemical Society Reviews*, vol. 36, no. 11, p. 1788, 2007.
- [201] G. Barthole, L. Lepiniec, P. M. Rogowsky, and S. Baud, "Controlling lipid accumulation in cereal grains.," *Plant science* □: *an international journal of experimental plant biology*, vol. 185–186, pp. 33–9, Apr. 2012.
- [202] J. Lippincott-Schwartz and R. D. Phair, "Lipids and Cholesterol as Regulators of Traffic in the Endomembrane System," *Annu Rev Biophys.*, vol. 39, pp. 559–578, 2010.
- [203] R. Yachi, Y. Uchida, B. H. Balakrishna, G. Anderluh, T. Kobayashi, T. Taguchi, and H. Arai, "Subcellular localization of sphingomyelin revealed by two toxin-based probes in mammalian cells.," *Genes to cells* □: *devoted to molecular & cellular mechanisms*, vol. 17, no. 8, pp. 720–7, Aug. 2012.
- [204] G. R. Matyas and D. J. Morré, "Subcellular distribution and biosynthesis of rat liver gangliosides.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 921, no. 3, pp. 599–614, Oct. 1987.
- [205] H. J. Sharpe, T. J. Stevens, and S. Munro, "A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties.," *Cell*, vol. 142, no. 1, pp. 158–69, Jul. 2010.
- [206] G. van Meer, "Dynamic transbilayer lipid asymmetry.," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 3, no. 5, May 2011.
- [207] A. Manuscript, "membrane □: roles in health and disease," vol. 44, no. 5, pp. 264–277, 2010.
- [208] R. F. a Zwaal, P. Comfurius, and E. M. Bevers, "Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells.," *Cellular and molecular life sciences* □: *CMLS*, vol. 62, no. 9, pp. 971–88, May 2005.
- [209] R. D. Baldrige and T. R. Graham, "Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 6, pp. E290–8, Feb. 2012.
- [210] T. Sasaki, S. Takasuga, J. Sasaki, S. Kofuji, S. Eguchi, M. Yamazaki, and A. Suzuki, "Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases.," *Progress in lipid research*, vol. 48, no. 6, pp. 307–43, Nov. 2009.
- [211] Y. Liu and V. a Bankaitis, "Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease.," *Progress in lipid research*, vol. 49, no. 3, pp. 201–17, Jul. 2010.
- [212] P. Mayinger, "Phosphoinositides and vesicular membrane traffic.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1821, no. 8, pp. 1104–13, Aug. 2012.
- [213] M. A. De Matteis and A. Godi, "PI-loting membrane traffic.," *Nature cell biology*, vol. 6, no. 6, pp. 487–92, Jun. 2004.
- [214] T. Kutateladze and M. Overduin, "Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 291, no. 5509, pp. 1793–6, Mar. 2001.
- [215] S. G. Jackson, Y. Zhang, R. J. Haslam, and M. S. Junop, "Structural analysis of the carboxy terminal PH domain of pleckstrin bound to D-myo-inositol 1,2,3,5,6-pentakisphosphate.," *BMC structural biology*, vol. 7, p. 80, Jan. 2007.
- [216] D. Sbrissa, O. C. Ikononov, and A. Shisheva, "Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 8, pp. 6073–9, Feb. 2002.
- [217] T. Noda, K. Matsunaga, N. Taguchi-Atarashi, and T. Yoshimori, "Regulation of membrane biogenesis in autophagy via PI3P dynamics.," *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 21, no. 7, pp. 671–6, Sep. 2010.
- [218] P. Mayinger, "Regulation of Golgi function via phosphoinositide lipids.," *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 20, no. 7, pp. 793–800, Sep. 2009.
- [219] M. Vicinanza, G. D'Angelo, a Di Campli, and M. a De Matteis, "Phosphoinositides as regulators of membrane trafficking in health and disease.," *Cellular and molecular life sciences* □: *CMLS*, vol. 65, no. 18, pp. 2833–41, Sep. 2008.
- [220] R. V Farese and T. C. Walther, "Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T.," *Cell*, vol. 139, no. 5, pp. 855–60, Nov. 2009.
- [221] Y. Ohsaki, J. Cheng, M. Suzuki, Y. Shinohara, A. Fujita, and T. Fujimoto, "Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1791, no. 6, pp. 399–407, Jun. 2009.
- [222] M. Digel, R. Ehehalt, and J. Füllekrug, "Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy.," *FEBS letters*, vol. 584, no. 11, pp. 2168–75, Jun. 2010.
- [223] H. Robenek, I. Buers, O. Hofnagel, M. J. Robenek, D. Troyer, and N. J. Severs, "Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1791, no. 6, pp. 408–18, Jun. 2009.
- [224] P. E. Bickel, J. T. Tansey, and M. a Welte, "PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1791, no. 6, pp. 419–40, Jun. 2009.

- [225] A. R. Kimmel, D. L. Brasaemle, M. McAndrews-Hill, C. Sztalryd, and C. Londos, "Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins," *Journal of lipid research*, vol. 51, no. 3, pp. 468–71, Mar. 2010.
- [226] K. Arisawa, I. Ichi, Y. Yasukawa, Y. Sone, and Y. Fujiwara, "Changes in the phospholipid fatty acid composition of the lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 adipocytes," *Journal of biochemistry*, pp. 1–9, Jul. 2013.
- [227] T. Fujimoto and R. G. Parton, "Not just fat: the structure and function of the lipid droplet," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 3, no. 3, Mar. 2011.
- [228] A. Penno, G. Hackenbroich, and C. Thiele, "Phospholipids and lipid droplets," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1831, no. 3, pp. 589–94, Mar. 2013.
- [229] N. Krahmer, Y. Guo, F. Wilfling, M. Hilger, S. Lingrell, K. Heger, H. W. Newman, M. Schmidt-Supprian, D. E. Vance, M. Mann, R. V Farese, and T. C. Walther, "Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase," *Cell metabolism*, vol. 14, no. 4, pp. 504–15, Oct. 2011.
- [230] Y. Horibata and H. Sugimoto, "StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria," *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 10, pp. 7358–65, Mar. 2010.
- [231] F. Wilfling, H. Wang, J. T. Haas, N. Krahmer, T. J. Gould, A. Uchida, J.-X. Cheng, M. Graham, R. Christiano, F. Fröhlich, X. Liu, K. K. Buhman, R. A. Coleman, J. Bewersdorf, R. V Farese, and T. C. Walther, "Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets," *Developmental cell*, vol. 24, no. 4, pp. 384–99, Feb. 2013.
- [232] J. Cheng, A. Fujita, Y. Ohsaki, M. Suzuki, Y. Shinohara, and T. Fujimoto, "Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets," *Histochemistry and cell biology*, vol. 132, no. 3, pp. 281–91, Sep. 2009.
- [233] T. Czabany, A. Wagner, D. Zweytick, K. Löhner, E. Leitner, E. Ingolic, and G. Daum, "Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 25, pp. 17065–74, Jun. 2008.
- [234] D. L. Brasaemle and N. E. Wolins, "Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation," *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, vol. Chapter 3, p. Unit 3.15, Jan. 2006.
- [235] D. L. Brasaemle, G. Dolios, L. Shapiro, and R. Wang, "Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes," *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 45, pp. 46835–42, Nov. 2004.
- [236] P. Liu, Y. Ying, Y. Zhao, D. I. Mundy, M. Zhu, and R. G. W. Anderson, "Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic," *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 5, pp. 3787–92, Jan. 2004.
- [237] S. Cermelli, Y. Guo, S. P. Gross, and M. a Welte, "The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot," *Current biology*, vol. 16, no. 18, pp. 1783–95, Sep. 2006.
- [238] B. D. M. Hodges and C. C. Wu, "Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets," *Journal of lipid research*, vol. 51, no. 2, pp. 262–73, Feb. 2010.
- [239] C. Londos, C. Sztalryd, J. T. Tansey, and a R. Kimmel, "Role of PAT proteins in lipid metabolism," *Biochimie*, vol. 87, no. 1, pp. 45–9, Jan. 2005.
- [240] J. T. Tansey, C. Sztalryd, E. M. Hlavin, A. R. Kimmel, and C. Londos, "The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis," *IUBMB life*, vol. 56, no. 7, pp. 379–85, Jul. 2004.
- [241] D. L. Brasaemle, "Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis," *Journal of lipid research*, vol. 48, no. 12, pp. 2547–59, Dec. 2007.
- [242] J. R. Skinner, L.-A. L. S. Harris, T. M. Shew, N. a Abumrad, and N. E. Wolins, "Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum," *Adipocyte*, vol. 2, no. 2, pp. 80–6, Apr. 2013.
- [243] R. E. K. Macpherson, S. V Ramos, R. Vandenboom, B. D. Roy, and S. J. Peters, "Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction," *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, vol. 304, no. 8, pp. R644–50, Apr. 2013.
- [244] D. L. Brasaemle, T. Barber, N. E. Wolins, G. Serrero, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos, "Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein," *Journal of lipid research*, vol. 38, no. 11, pp. 2249–63, Nov. 1997.
- [245] M. Fukushima, M. Enjoji, M. Kohjima, R. Sugimoto, S. Ohta, K. Kotoh, M. Kuniyoshi, K. Kobayashi, M. Imamura, T. Inoguchi, M. Nakamuta, and H. Nawata, "Adipose differentiation related protein induces lipid accumulation and lipid droplet formation in hepatic stellate cells," *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, vol. 41, no. 10, pp. 321–4, 2005.
- [246] M. Imamura, T. Inoguchi, S. Ikuyama, S. Taniguchi, K. Kobayashi, N. Nakashima, and H. Nawata, "ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts," *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 283, no. 4, pp. E775–83, Oct. 2002.

- [247] N. E. Wolins, B. Rubin, and D. L. Brasaemle, "TIP47 associates with lipid droplets.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 7, pp. 5101–8, Feb. 2001.
- [248] Y. Ohsaki, T. Maeda, M. Maeda, K. Tauchi-Sato, and T. Fujimoto, "Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 347, no. 1, pp. 279–87, Aug. 2006.
- [249] A. V. Bulankina, A. Deggerich, D. Wenzel, K. Mutenda, J. G. Wittmann, M. G. Rudolph, K. N. J. Burger, and S. Höning, "TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets.," *The Journal of cell biology*, vol. 185, no. 4, pp. 641–55, May 2009.
- [250] I. Buers, H. Robenek, S. Lorkowski, Y. Nitschke, N. J. Severs, and O. Hofnagel, "TIP47, a lipid cargo protein involved in macrophage triglyceride metabolism.," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 29, no. 5, pp. 767–73, May 2009.
- [251] N. E. Wolins, B. K. Quaynor, J. R. Skinner, M. J. Schoenfish, A. Tzekov, and P. E. Bickel, "S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 19, pp. 19146–55, May 2005.
- [252] N. E. Wolins, J. R. Skinner, M. J. Schoenfish, A. Tzekov, K. G. Bensch, and P. E. Bickel, "Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 39, pp. 37713–21, Sep. 2003.
- [253] H. Wang, M. Bell, U. Sreenivasan, H. Hu, J. Liu, K. Dalen, C. Londos, T. Yamaguchi, M. a Rizzo, R. Coleman, D. Gong, D. Brasaemle, and C. Sztalryd, "Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 18, pp. 15707–15, May 2011.
- [254] T. C. Walther and R. V. Farese, "Lipid droplets and cellular lipid metabolism.," *Annual review of biochemistry*, vol. 81, no. March, pp. 687–714, Jan. 2012.
- [255] F. B. Kraemer, V. K. Khor, W.-J. Shen, and S. Azhar, "Cholesterol ester droplets and steroidogenesis.," *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 371, no. 1–2, pp. 15–9, May 2013.
- [256] M. Suzuki, Y. Shinohara, Y. Ohsaki, and T. Fujimoto, "Lipid droplets: size matters.," *Journal of electron microscopy*, vol. 60 Suppl 1, no. Supplement 1, pp. S101–16, Jan. 2011.
- [257] M. Ricchi, M. R. Odoardi, L. Carulli, C. Anzivino, S. Ballestri, A. Pinetti, L. I. Fantoni, F. Marra, M. Bertolotti, S. Banni, A. Lonardo, N. Carulli, and P. Loria, "Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes.," *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 24, no. 5, pp. 830–40, May 2009.
- [258] L. L. Listenberger, X. Han, S. E. Lewis, S. Cases, R. V. Farese, D. S. Ory, and J. E. Schaffer, "Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 6, pp. 3077–82, Mar. 2003.
- [259] J. Spandl, D. Lohmann, L. Kuerschner, C. Moessinger, and C. Thiele, "Ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) localizes to lipid droplets and binds the E2 ubiquitin conjugase G2 (Ube2g2) via its G2 binding region.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 7, pp. 5599–606, Feb. 2011.
- [260] T. Fujimoto and Y. Ohsaki, "Proteasomal and autophagic pathways converge on lipid droplets.," *Autophagy*, vol. 2, no. 4, pp. 299–301.
- [261] T. Fujimoto and Y. Ohsaki, "Cytoplasmic lipid droplets: rediscovery of an old structure as a unique platform.," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1086, pp. 104–15, Nov. 2006.
- [262] Y. Ohsaki, J. Cheng, A. Fujita, T. Tokumoto, and T. Fujimoto, "Cytoplasmic Lipid Droplets Are Sites of Convergence of Proteasomal and Autophagic Degradation of Apolipoprotein B α .," vol. 17, no. June, pp. 2674–2683, 2006.
- [263] V. T. Salo, Y. Ohsaki, and E. Ikonen, "Lipid droplet biogenesis: when the endoplasmic reticulum starts to fatten up.," *Current opinion in lipidology*, vol. 22, no. 6, pp. 505–6, Dec. 2011.
- [264] J. Bouchoux, F. Beilstein, T. Pauquai, I. C. Guerrero, D. Chateau, N. Ly, M. Alqub, C. Klein, J. Chambaz, M. Rousset, J.-M. Lacorte, E. Morel, and S. Demignot, "The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2/TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics.," *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, vol. 103, no. 11, pp. 499–517, Nov. 2011.
- [265] S. Martin and R. G. Parton, "Characterization of Rab18, a lipid droplet-associated small GTPase.," *Methods in enzymology*, vol. 438, pp. 109–29, Jan. 2008.
- [266] M. R. Pulido, A. Diaz-Ruiz, Y. Jiménez-Gómez, S. Garcia-Navarro, F. Gracia-Navarro, F. Tinahones, J. López-Miranda, G. Frühbeck, R. Vázquez-Martínez, and M. M. Malagón, "Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity.," *PloS one*, vol. 6, no. 7, p. e22931, Jan. 2011.
- [267] Z. Purkrtova, P. Jolivet, M. Miquel, and T. Chardot, "Structure and function of seed lipid-body-associated proteins.," *Comptes rendus biologies*, vol. 331, no. 10, pp. 746–54, Oct. 2008.
- [268] V. B. Vance, C. Anthony, and H. Huang, "The Major Protein from Lipid Bodies of Maize. Characterization and structure based on cDNA cloning.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 262, no. 23, pp. 11275–11279, 1987.
- [269] a H. Huang, "Oleosins and oil bodies in seeds and other organs.," *Plant physiology*, vol. 110, no. 4, pp. 1055–61, Apr. 1996.
- [270] V. Parthibane, S. Rajakumari, V. Venkateshwari, R. Iyappan, and R. Rajasekharan, "Oleosin is bifunctional enzyme that has both

- monoacylglycerol acyltransferase and phospholipase activities.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 3, pp. 1946–54, Jan. 2012.
- [271] S. C. Bhatla, V. Kaushik, and M. K. Yadav, “Use of oil bodies and oleosins in recombinant protein production and other biotechnological applications.,” *Biotechnology advances*, vol. 28, no. 3, pp. 293–300, 2010.
- [272] M. Aridor and L. A. Hannan, “Traffic Jam□: A Compendium of Human Diseases that Affect Intracellular Transport Processes Endoplasmic Reticulum□: The First Stop,” pp. 836–851, 2000.
- [273] M. Aridor and L. a Hannan, “Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport.,” *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 3, no. 11, pp. 781–90, Nov. 2002.
- [274] A. Gow, C. M. Southwood, and R. A. Lazzarini, “Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease.,” *The Journal of cell biology*, vol. 140, no. 4, pp. 925–34, Feb. 1998.
- [275] N. Soejima, Y. Ohyagi, N. Nakamura, E. Himeno, K. M. Iinuma, N. Sakae, R. Yamasaki, T. Tabira, K. Murakami, K. Irie, N. Kinoshita, F. M. LaFerla, Y. Kiyohara, T. Iwaki, and J. Kira, “Intracellular accumulation of toxic turn amyloid-β is associated with endoplasmic reticulum stress in Alzheimer’s disease.,” *Current Alzheimer research*, vol. 10, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2013.
- [276] R. J. S. Viana, A. F. Nunes, and C. M. P. Rodrigues, “Endoplasmic Reticulum Enrollment in Alzheimer’s Disease,” *Molecular Neurobiology*, vol. 46, no. 2, pp. 522–534, Jul. 2012.
- [277] G. E. Tiller, V. L. Hannig, D. Dozier, L. Carrel, K. C. Trevarthen, W. R. Wilcox, S. Mundlos, J. L. Haines, A. K. Gedeon, and J. Gecz, “A recurrent RNA-splicing mutation in the SEDL gene causes X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda.,” *American journal of human genetics*, vol. 68, no. 6, pp. 1398–407, Jun. 2001.
- [278] R. G. Coussa and E. I. Traboulsi, “Choroideremia: a review of general findings and pathogenesis.,” *Ophthalmic genetics*, vol. 33, no. 2, pp. 57–65, Jun. 2012.
- [279] T. Tolmachova, O. E. Tolmachov, A. R. Barnard, S. R. de Silva, D. M. Lipinski, N. J. Walker, R. E. Maclaren, and M. C. Seabra, “Functional expression of Rab escort protein 1 following AAV2-mediated gene delivery in the retina of choroideremia mice and human cells ex vivo.,” *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, vol. 91, no. 7, pp. 825–37, Jul. 2013.
- [280] Y. Rbaibi, S. Cui, D. Mo, M. Carattino, R. Rohatgi, L. M. Satlin, C. M. Szalinski, L. M. Swanhart, H. Fölsch, N. A. Hukriede, and O. A. Weisz, “OCRL1 modulates cilia length in renal epithelial cells.,” *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 13, no. 9, pp. 1295–305, Sep. 2012.
- [281] A. Georges, J. Bonneau, D. Bonnefont-Rousselot, J. Champigneulle, J. P. Rabès, M. Abifadel, T. Aparicio, J. C. Guenedet, E. Bruckert, C. Boileau, A. Morali, M. Varret, L. P. Aggerbeck, and M. E. Samson-Bouma, “Molecular analysis and intestinal expression of SAR1 genes and proteins in Anderson’s disease (Chylomicron retention disease).,” *Orphanet journal of rare diseases*, vol. 6, no. 1, p. 1, Jan. 2011.
- [282] V. Gieselmann, “Lysosomal storage diseases.,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1270, no. 2–3, pp. 103–36, Apr. 1995.
- [283] K. D. Harrison, R. Q. Miao, C. Fernandez-Hernando, Y. Suárez, A. Dávalos, and W. C. Sessa, “Nogo-B receptor stabilizes Niemann-Pick type C2 protein and regulates intracellular cholesterol trafficking.,” *Cell metabolism*, vol. 10, no. 3, pp. 208–18, Sep. 2009.
- [284] X. Du and H. Yang, “Endosomal cholesterol trafficking□: protein factors at a glance Niemann-Pick type C Proteins,” vol. 45, no. 1, pp. 11–17, 2013.
- [285] W. B. Rizzo, “Sjögren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency.,” *Molecular genetics and metabolism*, vol. 90, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2007.
- [286] A. S. Wierzbicki, “Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review.,” *Biochemical Society transactions*, vol. 35, no. Pt 5, pp. 881–6, Nov. 2007.
- [287] R. J. A. Wanders and J. C. Komen, “Peroxisomes, Refsum’s disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid.,” *Biochemical Society transactions*, vol. 35, no. Pt 5, pp. 865–9, Nov. 2007.
- [288] R. J. a Wanders, J. Komen, and S. Ferdinandusse, “Phytanic acid metabolism in health and disease.,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1811, no. 9, pp. 498–507, Sep. 2011.
- [289] M. Schweiger, A. Lass, R. Zimmermann, T. O. Eichmann, and R. Zechner, “Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5.,” *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 297, no. 2, pp. E289–96, Aug. 2009.
- [290] M. Hori, K. Fujii, and M. Fujishima, “Micronucleus-specific bacterium *Holospira elegans* irreversibly enhances stress gene expression of the host *Paramecium caudatum*.,” *The Journal of eukaryotic microbiology*, vol. 55, no. 6, pp. 515–21, 2008.
- [291] D. D. Bowman, “Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma*.,” *Topics in companion animal medicine*, vol. 26, no. 4, pp. 173–7, Nov. 2011.
- [292] N. G. Langworthy, A. Renz, U. Mackenstedt, K. Henkle-Dührsen, M. B. de Bronsvort, V. N. Tanya, M. J. Donnelly, and A. J. Trees, “Macrophilicidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship.,” *Proceedings. Biological*

- sciences / The Royal Society*, vol. 267, no. 1448, pp. 1063–9, Jun. 2000.
- [293] J. Pizarro-Cerdá, A. Kühbacher, and P. Cossart, "Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view.," *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 2, no. 11, Nov. 2012.
- [294] K. Ray, B. Marteyn, P. J. Sansonetti, and C. M. Tang, "Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria.," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 7, no. 5, pp. 333–40, May 2009.
- [295] M.-P. Stein, M. P. Müller, and A. Wandinger-Ness, "Bacterial pathogens commandeer Rab GTPases to establish intracellular niches.," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 13, no. 12, pp. 1565–88, Dec. 2012.
- [296] J. a Oteo and A. Portillo, "Tick-borne rickettsioses in Europe.," *Ticks and tick-borne diseases*, vol. 3, no. 5–6, pp. 271–8, Dec. 2012.
- [297] E. E. Galyov, P. J. Brett, and D. DeShazer, "Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis.," *Annual review of microbiology*, vol. 64, pp. 495–517, Jan. 2010.
- [298] C. A. Hardiman, J. A. McDonough, H. J. Newton, and C. R. Roy, "The role of Rab GTPases in the transport of vacuoles containing *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*.," *Biochemical Society transactions*, vol. 40, no. 6, pp. 1353–9, Dec. 2012.
- [299] F. Lamoth and G. Greub, "Fastidious intracellular bacteria as causal agents of community-acquired pneumonia.," *Expert review of anti-infective therapy*, vol. 8, no. 7, pp. 775–90, Jul. 2010.
- [300] C. Pujol and J. B. Bliska, "Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular *yersiniae*.," *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, vol. 114, no. 3, pp. 216–26, Mar. 2005.
- [301] P. C. F. Oyston, "Francisella tularensis: unravelling the secrets of an intracellular pathogen.," *Journal of medical microbiology*, vol. 57, no. Pt 8, pp. 921–30, Aug. 2008.
- [302] M. Horn, "Chlamydiae as symbionts in eukaryotes.," *Annual review of microbiology*, vol. 62, pp. 113–31, Jan. 2008.
- [303] A. Collingro, P. Tischler, T. Weinmaier, T. Penz, E. Heinz, R. C. Brunham, T. D. Read, P. M. Bavoil, K. Sachse, S. Kahane, M. G. Friedman, T. Rattei, G. S. a Myers, and M. Horn, "Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae.," *Molecular biology and evolution*, vol. 28, no. 12, pp. 3253–70, Dec. 2011.
- [304] B. de Barbeyrac and C. Bébéar, "Chlamydia*," *Méd Mal Infect*, vol. 27, pp. 71–83, 1997.
- [305] M. R. Hammerschlag, "The intracellular life of chlamydiae.," *Seminars in pediatric infectious diseases*, vol. 13, no. 4, pp. 239–48, Oct. 2002.
- [306] K. Mölleken, E. Becker, and J. H. Hegemann, "The Chlamydia pneumoniae Invasin Protein Pmp21 Recruits the EGF Receptor for Host Cell Entry.," *PLoS pathogens*, vol. 9, no. 4, p. e1003325, Apr. 2013.
- [307] K. Hybiske and R. S. Stephens, "Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells.," *Infection and immunity*, vol. 75, no. 8, pp. 3925–34, Aug. 2007.
- [308] D. D. Rockey, J. Lenart, and R. S. Stephens, "MINIREVIEW Genome Sequencing and Our Understanding of Chlamydiae †," vol. 68, no. 10, pp. 5473–5479, 2000.
- [309] C. a Elwell, S. Jiang, J. H. Kim, A. Lee, T. Wittmann, K. Hanada, P. Melancon, and J. N. Engel, "Chlamydia trachomatis co-opts GEF1 and CERT to acquire host sphingomyelin for distinct roles during intracellular development.," *PLoS pathogens*, vol. 7, no. 9, p. e1002198, Sep. 2011.
- [310] S. Mirandola, D. Bowman, M. M. Hussain, and A. Alberti, "Hepatic steatosis in hepatitis C is a storage disease due to HCV interaction with microsomal triglyceride transfer protein (MTP).," *Nutrition & metabolism*, vol. 7, p. 13, Jan. 2010.
- [311] F. Negro and A. J. Sanyal, "Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data.," *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, vol. 29 Suppl 2, pp. 26–37, Mar. 2009.
- [312] D. Moradpour, F. Penin, and C. M. Rice, "Replication of hepatitis C virus.," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 5, no. 6, pp. 453–63, Jun. 2007.
- [313] B. D. Lindenbach, M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wölk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. a McKeating, and C. M. Rice, "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 309, no. 5734, pp. 623–6, Jul. 2005.
- [314] R. Gosert, D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour, "Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in," vol. 77, no. 9, pp. 5487–5492, 2003.
- [315] A. W. Tai, Y. Benita, L. F. Peng, S.-S. Kim, N. Sakamoto, R. J. Xavier, and R. T. Chung, "A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication.," *Cell host & microbe*, vol. 5, no. 3, pp. 298–307, Mar. 2009.
- [316] N.-Y. Hsu, O. Ilnytska, G. Belov, M. Santiana, Y.-H. Chen, P. M. Takvorian, C. Pau, H. van der Schaar, N. Kaushik-Basu, T. Balla, C. E. Cameron, E. Ehrenfeld, F. J. M. van Kuppeveld, and N. Altan-Bonnet, "Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication.," *Cell*, vol. 141, no. 5, pp. 799–811, May 2010.
- [317] C. Gallez, "Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées," 2005.

- [318] R. Vassar, "BACE1, The β -Secretase Enzyme in Alzheimer's Disease," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 23, pp. 105–113, 2004.
- [319] C. Haass, C. Kaether, G. Thinakaran, and S. Sisodia, "Trafficking and proteolytic processing of APP.," *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 2, no. 5, p. a006270, May 2012.
- [320] A. Elali and S. Rivest, "The role of ABCB1 and ABCA1 in beta-amyloid clearance at the neurovascular unit in Alzheimer's disease.," *Frontiers in physiology*, vol. 4, no. March, p. 45, Jan. 2013.
- [321] C. L. Masters and D. J. Selkoe, "Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease.," *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 2, no. 6, p. a006262, Jun. 2012.
- [322] X. Zhou and J. Xu, "Free cholesterol induces higher β -sheet content in A β peptide oligomers by aromatic interaction with Phe19.," *PloS one*, vol. 7, no. 9, p. e46245, Jan. 2012.
- [323] M. Fändrich, M. Schmidt, and N. Grigorieff, "Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures," *Trends Biochem Sci.*, vol. 36, no. 6, pp. 338–345, 2011.
- [324] F. J. Sepulveda, J. Parodi, R. W. Peoples, C. Opazo, and L. G. Aguayo, "Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property.," *PloS one*, vol. 5, no. 7, p. e11820, Jan. 2010.
- [325] M. Simons, P. Keller, J. Dichgans, and J. B. Schulz, "Cholesterol and Alzheimer's disease: Is there a link?," *Neurology*, vol. 57, no. 6, pp. 1089–1093, Sep. 2001.
- [326] A. M. Cárdenas, A. O. Ardiles, N. Barraza, X. Baéz-Matus, and P. Caviedes, "Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome.," *Archives of medical research*, vol. 43, no. 8, pp. 645–54, Dec. 2012.
- [327] E. Mandelkow, "Tau in Alzheimer ' s disease," vol. 8924, no. 98, pp. 425–427, 1998.
- [328] E. a Schon and E. Area-Gomez, "Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease.," *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 55, pp. 26–36, Jul. 2013.
- [329] Y. Sakagami, T. Kudo, H. Tanimukai, D. Kanayama, T. Omi, K. Horiguchi, M. Okochi, K. Imaizumi, and M. Takeda, "Involvement of endoplasmic reticulum stress in tauopathy.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 430, no. 2, pp. 500–4, Jan. 2013.
- [330] M. C. Morris, D. a Evans, J. L. Bienias, C. C. Tangney, D. a Bennett, N. Aggarwal, J. Schneider, and R. S. Wilson, "Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease.," *Archives of neurology*, vol. 60, no. 2, pp. 194–200, Feb. 2003.
- [331] V. Hirsch-Reinshagen, B. L. Burgess, and C. L. Wellington, "Why lipids are important for Alzheimer disease?," *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 326, no. 1–2, pp. 121–9, Jun. 2009.
- [332] P. Curatolo, R. Bombardieri, and S. Jozwiak, "Tuberous sclerosis.," *Lancet*, vol. 372, no. 9639, pp. 657–68, Aug. 2008.
- [333] M. J. Groenewoud and F. J. T. Zwartkruis, "Rheb and Rags come together at the lysosome to activate mTORC1.," *Biochemical Society transactions*, vol. 41, no. 4, pp. 951–5, Aug. 2013.
- [334] P. Fredman, H. von Holst, V. P. Collins, L. Granholm, and L. Svennerholm, "Sialyllactotetraosylceramide, a ganglioside marker for human malignant gliomas.," *Journal of neurochemistry*, vol. 50, no. 3, pp. 912–9, Mar. 1988.
- [335] C. J. Wikstrand, P. Fredman, R. R. McLendon, L. Svennerholm, and D. D. Bigner, "Altered expression of ganglioside phenotypes of human gliomas in vivo and in vitro.," *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid*, vol. 21, no. 2–3, pp. 129–38.
- [336] C. J. Wikstrand, P. Fredman, L. Svennerholm, and D. D. Bigner, "Detection of glioma-associated gangliosides GM2, GD2, GD3, 3'-isoLM1 3',6'-isoLD1 in central nervous system tumors in vitro and in vivo using epitope-defined monoclonal antibodies.," *Progress in brain research*, vol. 101, pp. 213–23, Jan. 1994.
- [337] M. Hanqing, N. Avrova, J. E. Månsson, K. Molin, and L. Svennerholm, "Gangliosides and neutral glycosphingolipids of normal tissue and oat cell carcinoma of human lung.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 878, no. 3, pp. 360–70, Oct. 1986.
- [338] J. R. Krycer and A. J. Brown, "Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1835, no. 2, pp. 219–29, Apr. 2013.
- [339] Y.-K. Lee and D. D. Moore, "Liver receptor homolog-1, an emerging metabolic modulator.," *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, vol. 13, pp. 5950–8, Jan. 2008.
- [340] P. M. Musille, M. C. Pathak, J. L. Lauer, W. H. Hudson, P. R. Griffin, and E. A. Ortlund, "Antidiabetic phospholipid-nuclear receptor complex reveals the mechanism for phospholipid-driven gene regulation.," *Nature structural & molecular biology*, vol. 19, no. 5, pp. 532–7, S1–2, May 2012.
- [341] P. M. Musille, J. A. Kohn, and E. A. Ortlund, "Phospholipid-driven gene regulation.," *FEBS letters*, vol. 587, no. 8, pp. 1238–46, Apr. 2013.
- [342] K. Sun, C. M. Kusminski, and P. E. Scherer, "Adipose tissue remodeling and obesity," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, no. 6, pp. 2094–2101, 2011.
- [343] T. Suganami, M. Tanaka, and Y. Ogawa, "Adipose tissue inflammation and ectopic lipid

- accumulation.,” *Endocrine journal*, vol. 59, no. 10, pp. 849–57, Jan. 2012.
- [344] T. Kadowaki, T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe, “Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 7, pp. 1784–1792, 2006.
- [345] S. Carter, A. Caron, D. Richard, and F. Picard, “Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients.,” *Clinical interventions in aging*, vol. 8, pp. 829–44, Jan. 2013.
- [346] G. Murdolo, M. Piroddi, F. Luchetti, C. Tortoioli, B. Canonico, C. Zerbinati, F. Galli, and L. Iuliano, “Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance.,” *Biochimie*, vol. 95, no. 3, pp. 585–94, Mar. 2013.
- [347] B. Klop, J. W. F. Elte, and M. C. Cabezas, “Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets.,” *Nutrients*, vol. 5, no. 4, pp. 1218–40, Jan. 2013.
- [348] S. Cowey and R. W. Hardy, “The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer?,” *The American journal of pathology*, vol. 169, no. 5, pp. 1505–22, Nov. 2006.
- [349] H. Flanagan-Steet, S. Johnson, R. D. Smith, J. Bangiyeva, V. Lupashin, and R. Steet, “Mislocalization of large ARF-GEFs as a potential mechanism for BFA resistance in COG-deficient cells.,” *Experimental cell research*, vol. 317, no. 16, pp. 2342–52, Oct. 2011.
- [350] X. Zhao, A. Claude, J. Chun, D. J. Shields, J. F. Presley, and P. Melançon, “GBF1, a cis-Golgi and VTCs-localized ARF-GEF, is implicated in ER-to-Golgi protein traffic.,” *Journal of cell science*, vol. 119, no. Pt 18, pp. 3743–53, Sep. 2006.
- [351] M. Théry, V. Racine, M. Piel, A. Pépin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.-B. Sibarita, and M. Bornens, “Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 52, pp. 19771–6, Dec. 2006.
- [352] K. Schauer, T. Duong, K. Bleakley, S. Bardin, M. Bornens, and B. Goud, “Probabilistic density maps to study global endomembrane organization.,” *Nature methods*, vol. 7, no. 7, pp. 560–6, Jul. 2010.
- [353] A. Azioune, M. Storch, M. Bornens, M. Théry, and M. Piel, “Simple and rapid process for single cell micro-patterning.,” *Lab on a chip*, vol. 9, no. 11, pp. 1640–2, Jun. 2009.
- [354] A. Azioune, N. Carpi, Q. Tseng, M. Théry, and M. Piel, “Protein micropatterns: A direct printing protocol using deep UVs.,” *Methods in cell biology*, vol. 97, no. 10, pp. 133–46, Jan. 2010.
- [355] T. Niu, A. C. Pfeifer, J. Lippincott-Schwartz, and C. L. Jackson, “Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-Sensitive Arf1 Exchange Factor at the Golgi □,” vol. 16, no. March, pp. 1213–1222, 2005.
- [356] E. L. Snapp, N. Altan, and J. Lippincott-Schwartz, “Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells.,” *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, vol. Chapter 21, p. Unit 21.1, Aug. 2003.
- [357] J. Lippincott-Schwartz and G. H. Patterson, “Development and use of fluorescent protein markers in living cells.,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, no. 5616, pp. 87–91, Apr. 2003.
- [358] Y. Mazaki, Y. Nishimura, and H. Sabe, “GBF1 bears a novel phosphatidylinositol-phosphate binding module, BP3K, to link PI3Ky activity with Arf1 activation involved in GPCR-mediated neutrophil chemotaxis and superoxide production.,” *Molecular biology of the cell*, vol. 23, no. 13, pp. 2457–67, Jul. 2012.
- [359] Y. J. Kim, M. L. Guzman-Hernandez, and T. Balla, “A Highly Dynamic ER-Derived Phosphatidylinositol-Synthesizing Organelle Supplies Phosphoinositides to Cellular Membranes,” *Developmental Cell*, vol. 21, no. 5, pp. 813–824, Nov. 2011.
- [360] Q. T. Bui, M.-P. Golinelli-Cohen, and C. L. Jackson, “Large Arf1 guanine nucleotide exchange factors: evolution, domain structure, and roles in membrane trafficking and human disease.,” *Molecular genetics and genomics* □: MGG, vol. 282, no. 4, pp. 329–50, Oct. 2009.
- [361] E. R. Hinson and P. Cresswell, “The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 48, pp. 20452–7, Dec. 2009.
- [362] S. Murugesan, E. B. Goldberg, E. Dou, and W. J. Brown, “Identification of Diverse Lipid Droplet Targeting Motifs in the PNPLA Family of Triglyceride Lipases,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, p. e64950, May 2013.
- [363] J. B. Sáenz, W. J. Sun, J. W. Chang, J. Li, B. Bursulaya, N. S. Gray, and D. B. Haslam, “Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function.,” *Nature chemical biology*, vol. 5, no. 3, pp. 157–65, Mar. 2009.
- [364] J. Lowery, T. Szul, M. Styers, Z. Holloway, V. Oorschot, J. Klumperman, and E. Sztul, “The Sec7 guanine nucleotide exchange factor GBF1 regulates membrane recruitment of BIG1 and BIG2 to the trans-Golgi network (TGN).,” *The Journal of biological chemistry*, Feb. 2013.
- [365] B. S. Wilson, C. Nuoffer, J. L. Meinkoth, M. McCaffery, J. R. Feramisco, W. E. Balch, and M. G. Farquhar, “A Rab1 mutant affecting guanine nucleotide exchange promotes disassembly of the Golgi apparatus.,” *The Journal of cell biology*, vol. 125, no. 3, pp. 557–71, May 1994.
- [366] C. Wang, Y. Yoo, H. Fan, E. Kim, K.-L. Guan, and J.-L. Guan, “Regulation of Integrin β 1 recycling to lipid rafts by Rab1a to promote cell migration.,”

- The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 38, pp. 29398–405, Sep. 2010.
- [367] A. Mukhopadhyay, E. Nieves, F.-Y. Che, J. Wang, L. Jin, J. W. Murray, K. Gordon, R. H. Angeletti, and A. W. Wolkoff, "Proteomic analysis of endocytic vesicles: Rab1a regulates motility of early endocytic vesicles.," *Journal of cell science*, vol. 124, no. Pt 5, pp. 765–75, Mar. 2011.
- [368] K. Dumaresq-Doiron, M.-F. Savard, S. Akam, S. Costantino, and S. Lefrançois, "The phosphatidylinositol 4-kinase PI4KIIIalpha is required for the recruitment of GBF1 to Golgi membranes.," *Journal of cell science*, vol. 123, no. Pt 13, pp. 2273–80, Jul. 2010.
- [369] I. Nevo-Yassaf, Y. Yaffe, M. Asher, O. Ravid, S. Eizenberg, Y. I. Henis, Y. Nahmias, K. Hirschberg, and E. H. Sklan, "Role for TBC1D20 and Rab1 in hepatitis C virus replication via interaction with lipid droplet-bound nonstructural protein 5A.," *Journal of virology*, vol. 86, no. 12, pp. 6491–502, Jun. 2012.
- [370] K. Takashima, A. Saitoh, S. Hirose, W. Nakai, Y. Kondo, Y. Takasu, H. Kakeya, H.-W. Shin, and K. Nakayama, "GBF1-Arf-COPI-ArfGAP-mediated Golgi-to-ER transport involved in regulation of lipid homeostasis.," *Cell structure and function*, vol. 36, no. 2, pp. 223–35, Jan. 2011.
- [371] D. S. Auld, B. Oliver, M. Beller, C. Sztalryd, N. Southall, M. Bell, and H. Ja, "COPI Complex Is a Regulator of Lipid Homeostasis," vol. 6, no. 11, 2008.
- [372] C. M. Jenkins, D. J. Mancuso, W. Yan, H. F. Sims, B. Gibson, and R. W. Gross, "Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 47, pp. 48968–75, Nov. 2004.
- [373] T. O. Eichmann, M. Kumari, J. T. Haas, R. V. Farese, R. Zimmermann, A. Lass, and R. Zechner, "Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O-acyltransferases.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 49, pp. 41446–57, Nov. 2012.
- [374] R. Zimmermann, J. G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter, and R. Zechner, "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 306, no. 5700, pp. 1383–6, Nov. 2004.
- [375] J. G. Granneman, H.-P. H. Moore, R. L. Granneman, A. S. Greenberg, M. S. Obin, and Z. Zhu, "Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 8, pp. 5726–35, Feb. 2007.
- [376] M. Rossmeisl, P. Flachs, P. Brauner, J. Sponarova, O. Matejkova, T. Prazak, J. Ruzickova, K. Bardova, O. Kuda, and J. Kopecky, "Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores.," *International journal of obesity and related metabolic disorders*: journal of the International Association for the Study of Obesity, vol. 28 Suppl 4, pp. S38–44, Dec. 2004.
- [377] T. Miyamoto, N. Oshiro, K. Yoshino, A. Nakashima, S. Eguchi, M. Takahashi, Y. Ono, U. Kikkawa, and K. Yonezawa, "AMP-activated protein kinase phosphorylates Golgi-specific brefeldin A resistance factor 1 at Thr1337 to induce disassembly of Golgi apparatus.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 7, pp. 4430–8, Feb. 2008.
- [378] L. Mao, N. Li, Y. Guo, X. Xu, L. Gao, Y. Xu, L. Zhou, and W. Liu, "AMPK phosphorylates GBF1 for mitotic Golgi disassembly.," *Journal of cell science*, vol. 126, no. Pt 6, pp. 1498–505, Mar. 2013.
- [379] Y. Morohashi, Z. Balklava, M. Ball, H. Hughes, and M. Lowe, "Phosphorylation and membrane dissociation of the ARF exchange factor GBF1 in mitosis.," *The Biochemical journal*, vol. 427, no. 3, pp. 401–12, May 2010.
- [380] A.-R. Thiam, B. Antonny, J. Wang, J. Delacotte, F. Wilfling, T. C. Walther, R. Beck, J. E. Rothman, and F. Pincet, "COPI buds 60 nm lipid droplets from reconstituted water-phospholipid-triacylglyceride interfaces, suggesting a tension clamp function," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. in press, 2013.
- [381] M. Fujimoto and T. Hayashi, "New insights into the role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane.," *International review of cell and molecular biology*, vol. 292, pp. 73–117, Jan. 2011.
- [382] C. N. Poston, S. C. Krishnan, and C. R. Bazemore-Walker, "In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM).," *Journal of proteomics*, vol. 79, pp. 219–30, Feb. 2013.
- [383] J. Bigay and B. Antonny, "Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity.," *Developmental cell*, vol. 23, no. 5, pp. 886–95, Nov. 2012.
- [384] B. J. Peter, H. M. Kent, I. G. Mills, Y. Vallis, P. J. G. Butler, P. R. Evans, and H. T. McMahon, "BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, no. 5657, pp. 495–9, Jan. 2004.
- [385] M. Masuda and N. Mochizuki, "Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane.," *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 21, no. 4, pp. 391–8, Jun. 2010.
- [386] S. Suetsugu, K. Toyooka, and Y. Senju, "Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins.," *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 21, no. 4, pp. 340–9, Jun. 2010.
- [387] I. M. Pranke, V. Morello, J. Bigay, K. Gibson, J.-M. Verbavatz, B. Antonny, and C. L. Jackson, "α-Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates

selective vesicle binding.," *The Journal of cell biology*, vol. 194, no. 1, pp. 89–103, Jul. 2011.

- [388] S. Boulant, R. Montserret, R. G. Hope, M. Ratnier, P. Targett-Adams, J.-P. Laverne, F. Penin, and J. McLauchlan, "Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 31, pp. 22236–47, Aug. 2006.

9 Annexes

9.1 Article

S. Bouvet, M.-P. Golinelli-Cohen, V. Contremoulins and C. L. Jackson, “Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes.,” *Journal of Cell Sciences*. 2013 *in press*

Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes

Samuel Bouvet^{1,2}, Marie-Pierre Golinelli-Cohen^{1,*}, Vincent Contremoulins^{1,3} and Catherine L. Jackson^{1,2,‡}

¹Institut Jacques Monod, CNRS, UMR 7592, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75205 Paris, France

²Membrane Dynamics and Intracellular Trafficking, Institut Jacques Monod, Paris, France

³ImagoSeine Bioluminescence Core Facility, Institut Jacques Monod, Paris, France

*Present address: Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR2301, 91190, Gif-sur-Yvette, France

‡Author for correspondence (jackson@ijm.univ-paris-diderot.fr)

Accepted 16 July 2013

Journal of Cell Science 126, 4794–4805

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.134254

Summary

Lipid droplet metabolism and secretory pathway trafficking both require activation of the Arf1 small G protein. The spatiotemporal regulation of Arf1 activation is mediated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) of the GBF and BIG families, but the mechanisms of their localization to multiple sites within cells are poorly understood. Here we show that GBF1 has a lipid-binding domain (HDS1) immediately downstream of the catalytic Sec7 domain, which mediates association with both lipid droplets and Golgi membranes in cells, and with bilayer liposomes and artificial droplets *in vitro*. An amphipathic helix within HDS1 is necessary and sufficient for lipid binding, both *in vitro* and in cells. The HDS1 domain of GBF1 is stably associated with lipid droplets in cells, and the catalytic Sec7 domain inhibits this potent lipid-droplet-binding capacity. Additional sequences upstream of the Sec7 domain–HDS1 tandem are required for localization to Golgi membranes. This mechanism provides insight into crosstalk between lipid droplet function and secretory trafficking.

Key words: Lipid droplet, Arf1 small G protein, Lipid binding domain, Golgi, Amphipathic helix, Guanine nucleotide exchange factor (GEF)

Introduction

Organelle identity is maintained dynamically by specific recruitment of proteins to membranes of a characteristic lipid composition. In many cases, an organelle is defined by a combination of a rare lipid and specific proteins, most commonly phosphoinositides and activated small G proteins (Behnia and Munro, 2005). This combination allows peripheral proteins such as protein coats, lipid modifying enzymes and actin cytoskeleton regulators to associate specifically with each compartment and contribute to their functioning and maturation. Although small G proteins such as Arf1 and Rab1 are known to function in recruiting proteins to membranes of the early secretory pathway (Gillingham and Munro, 2007), these membranes lack a characteristic phosphorylated phosphoinositide to confer compartment identity. Instead, other signature features of these compartments are used as targeting information, such as lipid packing defects, that are sensed by a specific class of amphipathic helices (Bigay and Antonny, 2012; Vamparys et al., 2013; Vanni et al., 2013).

Lipid droplets (LDs), the major energy storage depots of eukaryotic cells, are now recognized as bona fide organelles that interface with membrane trafficking pathways (Liu et al., 2004; Walther and Farese, 2012). They are distinct from other organelles in having a neutral lipid core surrounded by a phospholipid monolayer rather than a bilayer encompassing an aqueous interior. However, the composition of the phospholipids encircling LDs shares features with that of early secretory pathway membranes, notably its lack of a specific phosphorylated phosphoinositide as a compartment marker

(Bartz et al., 2007a). In addition to triglycerides, which are the major energy storage molecules of eukaryotic cells, the neutral lipid core of LDs also contains esterified cholesterol. These two classes of neutral lipids serve as storage precursors of the two major lipid components of cellular membranes. In yeast, it has been shown that trafficking through the secretory pathway is coordinated with storage of neutral lipids in LDs, probably to provide the cell with the capacity to respond rapidly to demands for new membrane synthesis when growth is stimulated, and to channel newly synthesized membrane precursors from the ER to LDs for storage when growth is inhibited (Gaspar et al., 2011; Gaspar et al., 2008).

The metabolism of LDs has received considerable attention in recent years because of their central role in metabolic diseases, notably lipodystrophies and obesity (Walther and Farese, 2012; Zechner et al., 2012). Obesity is a particularly serious health concern because of its prevalence, and its predisposition to serious illnesses such as diabetes, fatty liver disease, heart disease and cancer (Bozza and Viola, 2010; Cohen et al., 2011; Greenberg et al., 2011). LDs are also required for the infectious cycle of pathogens such as hepatitis C virus, Dengue virus and *Chlamydia*, which target fat metabolic cells and/or lipid metabolic pathways for their propagation (Saka and Valdivia, 2012; Stehr et al., 2012).

Both the mechanisms linking LDs to the secretory pathway, and targeting of proteins to the LD surface are poorly understood. We and others have identified a crucial role of the Arf1 small G protein and its regulators in recruitment of LD-associated proteins to the LD surface, a function that is evolutionarily

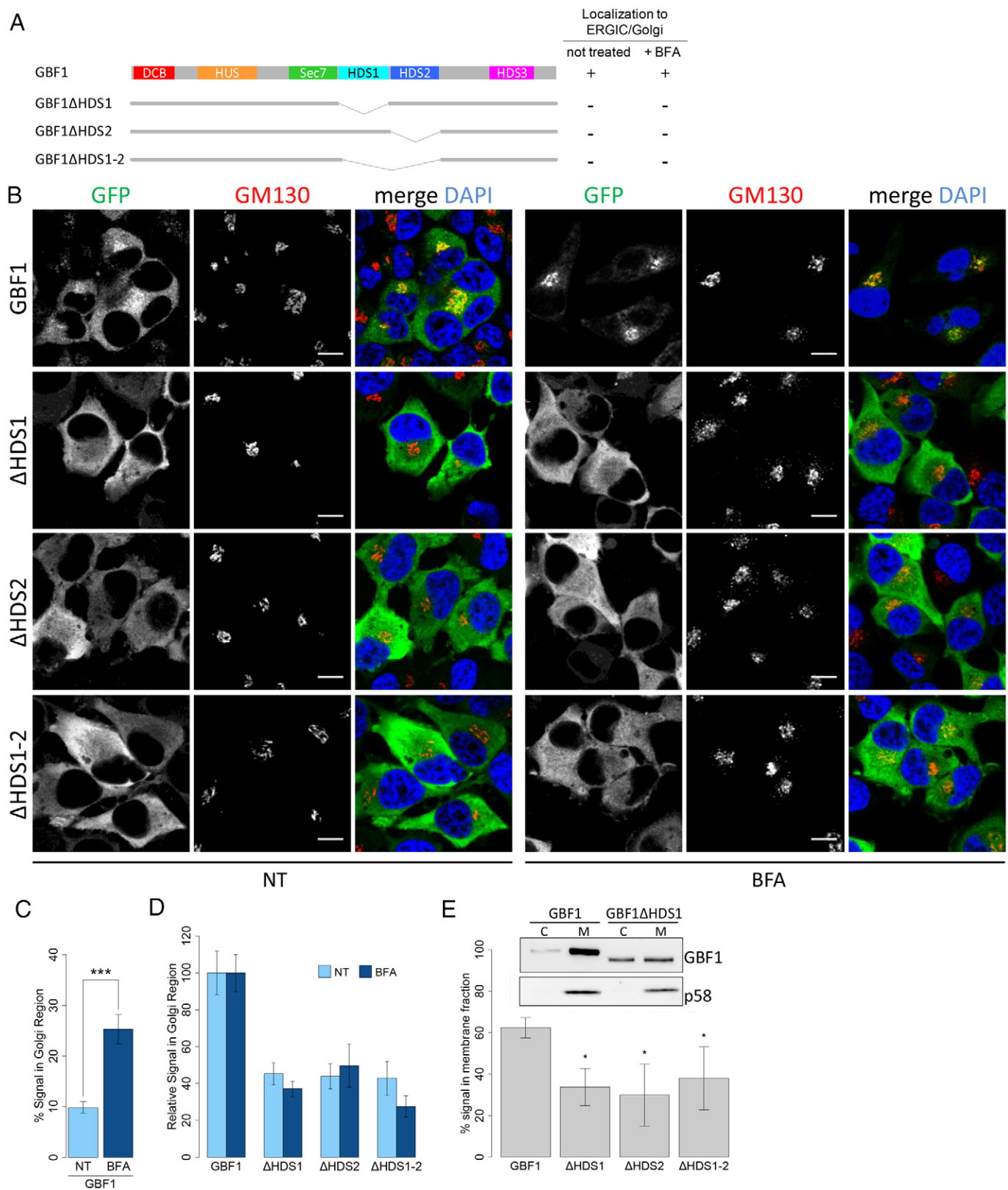


Fig. 1 See next page for legend.

Fig. 1. The C-terminal HDS1 and HDS2 domains are required for GBF1 association with ERGIC and Golgi membranes in cells. (A) Schematic diagram of GBF1 showing homology domains and deletion constructs (left panel), and summary of localization results (right panel). (B) HeLa cells expressing the indicated GFP-GBF1 construct were treated with 10 μ g/ml BFA (BFA) or DMSO alone (NT, not treated) for 10 minutes at 37°C. Cells were then fixed and immunostained for Golgi colocalization as described in Materials and Methods. Scale bars: 10 μ m. (C,D) Quantification of experiments shown in B. Localization of wild-type GBF1 (C) or GBF1 deletion mutants (D) in the Golgi region was calculated as described in Materials and Methods. In D, values were normalized against wild-type GBF1. *** $P < 10^{-10}$ (Standard *t*-test); (E) HeLa cells expressing the indicated GFP-GBF1 construct were incubated with 10 μ g/ml BFA for 10 minutes at 37°C before harvesting and fractionation. The blot shown is representative of at least three independent experiments. p58 (ERGIC53), is a marker of the membrane fraction. C, cytosolic fraction; M, membrane fraction. Band density was quantified using ImageJ (NIH) and the amount of membrane-bound protein was calculated as described in Materials and Methods. Error bars represent the 95% confidence interval. * $P < 0.01$ (standard Student *t*-test).

conserved from *Drosophila* to humans (Beller et al., 2008; Guo et al., 2008; Soni et al., 2009). However, the mechanisms by which Arf1 and its regulators themselves are recruited to LDs are not well understood. In the secretory pathway, Arf1 is involved in recruitment of coats to membranes to form transport vesicles (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003). At the *cis*-Golgi, the Arf1 activator GBF1, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) that switches Arf1 from its inactive GDP-bound to active GTP-bound form, recruits the COPI coat to membranes, the first step in formation of COPI-coated vesicles (Beck et al., 2009). At the *trans*-Golgi, Arf1 is activated by members of a distinct family of GEFs, the BIG/Sec7 family. The GBF and BIG GEFs are large proteins that share a common domain structure (Bui et al., 2009; Gillingham and Munro, 2007). Among these large Arf GEFs, the mechanism of recruitment of the BIG/Sec7 proteins is the best characterized. However, two distinct localization mechanisms involving direct interactions with the BIG GEF proteins have been demonstrated (Christis and Munro, 2012; Richardson et al., 2012). The HDS1 domain downstream of the catalytic domain of yeast Sec7p is necessary for binding to membranes in an Arf1-dependent manner, as part of a positive feedback loop enhancing membrane binding (Richardson et al., 2012). It has also been shown that the N-terminus of the mammalian and *Drosophila* homologue of Sec7p, BIG1, interacts with the small G protein Arl1, a *trans*-Golgi-localized protein, which mediates the specific recruitment of BIG1 to *trans*-Golgi membranes (Christis and Munro, 2012). How these two localization mechanisms are coordinated is not known. For the GBF family of GEFs, the N-terminal region of mammalian GBF1 has been shown to interact directly with Rab1, which contributes to its localization to the Golgi (Monetta et al., 2007). Here we show that two regions of GBF1, both the HDS1 domain and the N-terminus, are required for its Golgi localization, whereas the HDS1 domain alone is required for localization to LDs. We show that the HDS1 domain is a lipid-binding domain, which can associate both with bilayer liposomes and LDs, *in vitro* and in cells, through an amphipathic helix within the domain.

Results

The HDS1 and HDS2 domains of GBF1 are required for localization to both LDs and Golgi membranes

In cells under normal growth conditions, GBF1 localizes primarily to membranes of the early secretory pathway,

including the *cis*-Golgi and the ER–Golgi intermediate compartment (ERGIC), cycling dynamically between membranes and cytosol (Garcia-Mata et al., 2003; Niu et al., 2005; Zhao et al., 2006). We made the surprising observation that the HDS1 and HDS2 domains of GBF1 (shown schematically in Fig. 1A) localize to LDs, and not to the Golgi, when expressed on their own in cells treated with fatty acids (Ellong et al., 2011) (see also Fig. 3C). However, this result is consistent with the known role of GBF1 in LD metabolism, including localization of the full-length protein to LDs in fatty-acid-treated cells (Soni et al., 2009), and leads to two hypotheses: either HDS1 and HDS2 localize only to LDs, and other domains of GBF1 specifically target the protein to secretory pathway membranes, or HDS1 and HDS2 mediate localization to both sites in a regulated manner. To distinguish between these possibilities, we tested localization of GBF1 and deletions of HDS1, HDS2 or the two domains together (Fig. 1). Treatment of cells with the Arf1-GEF inhibitor brefeldin A (BFA) for 10–20 minutes leads to an increase in the amount of GBF1 on ERGIC elements and the Golgi, as determined by both fluorescence microscopy and fractionation (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005; Zhao et al., 2006). As is the case for certain other peripherally associated Golgi proteins that cycle dynamically between membranes and cytosol, release from Golgi membranes occurs during the fractionation procedure (Panic et al., 2003), but for GBF1, treatment of cells with BFA prior to fractionation appears to protect this release from membranes, at least partially, resulting in ~60% of the protein remaining associated with the membrane fraction (supplementary material Fig. S1). In contrast, deletion of either the HDS1 or the HDS2 domain, or both together, resulted in a primarily cytosolic localization of the protein as assayed by fluorescence imaging (Fig. 1B–D) or subcellular fractionation (Fig. 1E). Quantification of fluorescence images demonstrated that the HDS1 and HDS2 deletion mutants were significantly delocalized from the perinuclear Golgi region, both in the absence and presence of BFA (Fig. 1B,C). Hence the HDS1 and HDS2 domains are required for GBF1 localization to ERGIC and Golgi membranes. Deletion of the entire C-terminal portion of GBF1 downstream of the catalytic Sec7 domain abolished the association of the protein with Golgi and ERGIC membranes, in the presence or absence of BFA, as monitored both by fluorescence microscopy and subcellular fractionation (supplementary material Fig. S2). However, truncations removing sequences downstream of the HDS1 and HDS2 domains all resulted in localization to membranes in both assays (supplementary material Fig. S2), indicating that no other regions of the GBF1 C-terminal region are required for membrane targeting. Hence the HDS1 and HDS2 domains of GBF1 are required both for localization to secretory pathway membranes and to LDs.

HDS1 is a lipid-binding domain

To determine the mechanism by which the HDS1 domain localizes to membranes, we purified HDS1 as a GST fusion from *Escherichia coli*, and tested binding to liposomes *in vitro* using a sucrose gradient flotation assay. We tested liposomes of different compositions, including a phospholipid mixture derived from soybeans called azolectin [~55% phosphatidylcholine (PC), 20% phosphatidylethanolamine (PE), and other less abundant phospholipid species], a mixture of phospholipids of composition similar to Golgi membranes [‘Golgi mix’: 50% egg

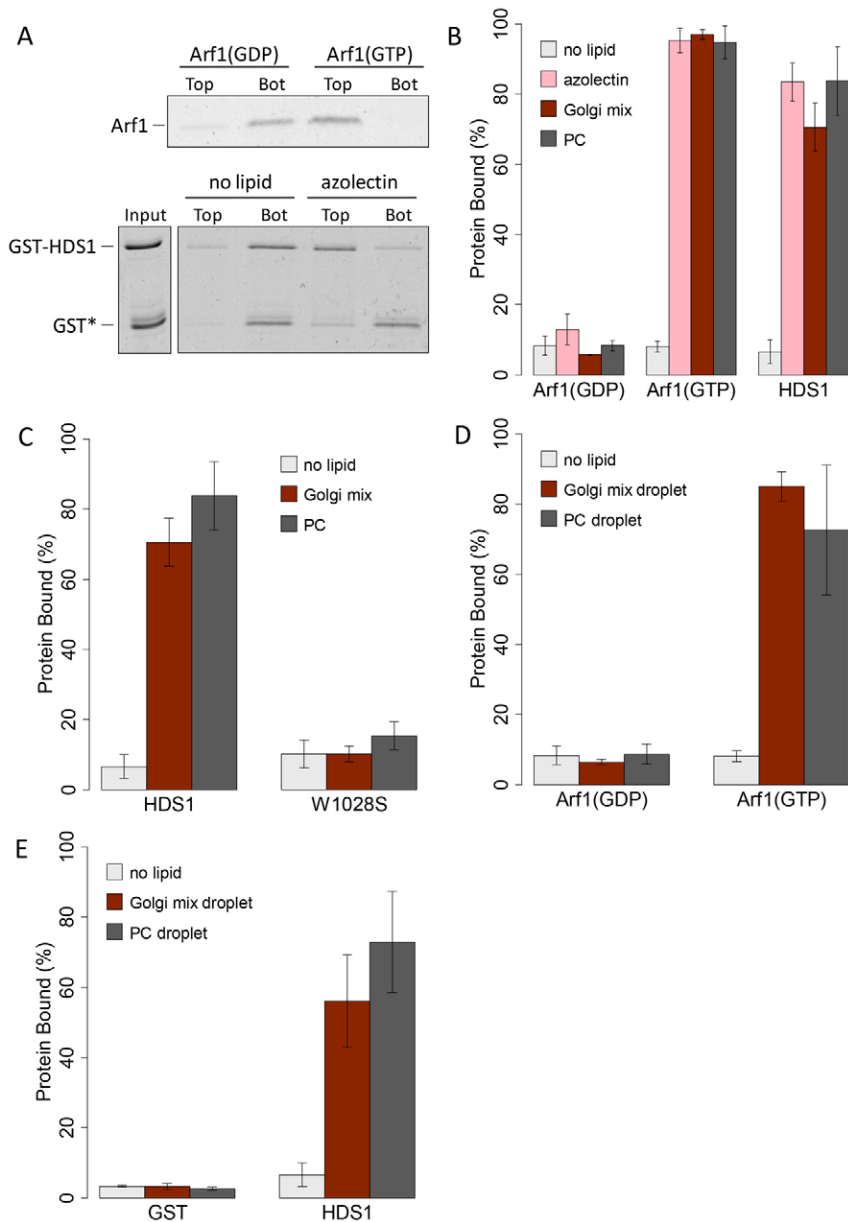


Fig. 2. HDS1 binds to liposomes and artificial droplets *in vitro*. (A) Myr-Arf1 loaded with GDP or with GTP (top panel), or GST-HDS1 (bottom panel), were incubated with or without azolectin liposomes at 37°C for 30 minutes. Sucrose gradient flotations were performed as described in Materials and Methods. Top: top fraction. Bot: bottom fraction. (B,C) Sucrose gradient flotations were performed with azolectin liposomes (in B only), liposomes of defined composition similar to Golgi membranes (Golgi mix), egg PC liposomes (PC) or without liposomes (no lipid). The percentage bound protein is the ratio of protein in the top fraction to the sum of the intensities in the top and the bottom fractions, expressed as a percentage. W1028S indicates GST-HDS1 with the W1028S point mutation (GST-HDS1 W1028S). (D) Myr-Arf1 loaded with GDP or with GTP was incubated at 37°C for 30 minutes with or without artificial droplets prepared using Golgi mix phospholipids (Golgi mix droplet) or egg PC (PC droplets). (E) GST or GST-HDS1 incubated as in D in the absence (no lipid) or in the presence of Golgi mix or PC droplets. Error bars represent the standard deviation of at least three independent experiments.

PC, 19% egg PE, 10% liver phosphatidylinositol (PI), 5% brain phosphatidylserine (PS), and 16% cholesterol, where the percentage given is a molar ratio] (Bigay et al., 2005) or pure egg PC. We found that the HDS1 domain showed a high level of binding to azolectin liposomes, to an extent approaching that of myristoylated Arf1-GTP (Fig. 2A,B). HDS1 also showed high levels of binding to Golgi mix liposomes, and to pure PC liposomes (Fig. 2B). A single point mutation of a highly conserved tryptophan residue (HDS1-W1028S, see below) severely inhibited liposome binding (Fig. 2C). These results indicate that HDS1 is a direct lipid-binding domain. Interestingly, the HDS1 domain of GBF1 is able to bind to liposomes containing only neutral lipids, and therefore does not have a requirement *in vitro* for charged or rare lipids (e.g. phosphorylated PIs). Furthermore, the GBF1 lipid-binding HDS1 domain does not require another protein, such as Arf1, to efficiently bind to liposomes, a property that differs from yeast

Sec7p, which does require Arf1-GTP for lipid binding *in vitro* (Richardson et al., 2012). Hence, although GBF1 shares a similar domain structure with that of members of the BIG/Sec7 family of Arf GEFs (its HDS1 domain shares 23% identity and 45% similarity with that of yeast Sec7p), the two GEFs appear to differ in their requirement for Arf1 for lipid binding.

HDS1 binds to artificial droplets *in vitro*

We sought to test the ability of HDS1 to associate with artificial LDs *in vitro*, using a recently developed *in vitro* method to produce artificial droplets and assay protein binding by flotation analysis (see Materials and Methods). Artificial LDs can be formed by combining triglycerides and phospholipids, and are stable when the level of PC, which acts as a surfactant, is sufficiently high (Krahmer et al., 2011). Below this concentration, an emulsion of small LDs (less than a micrometer in diameter) in aqueous buffer undergo spontaneous

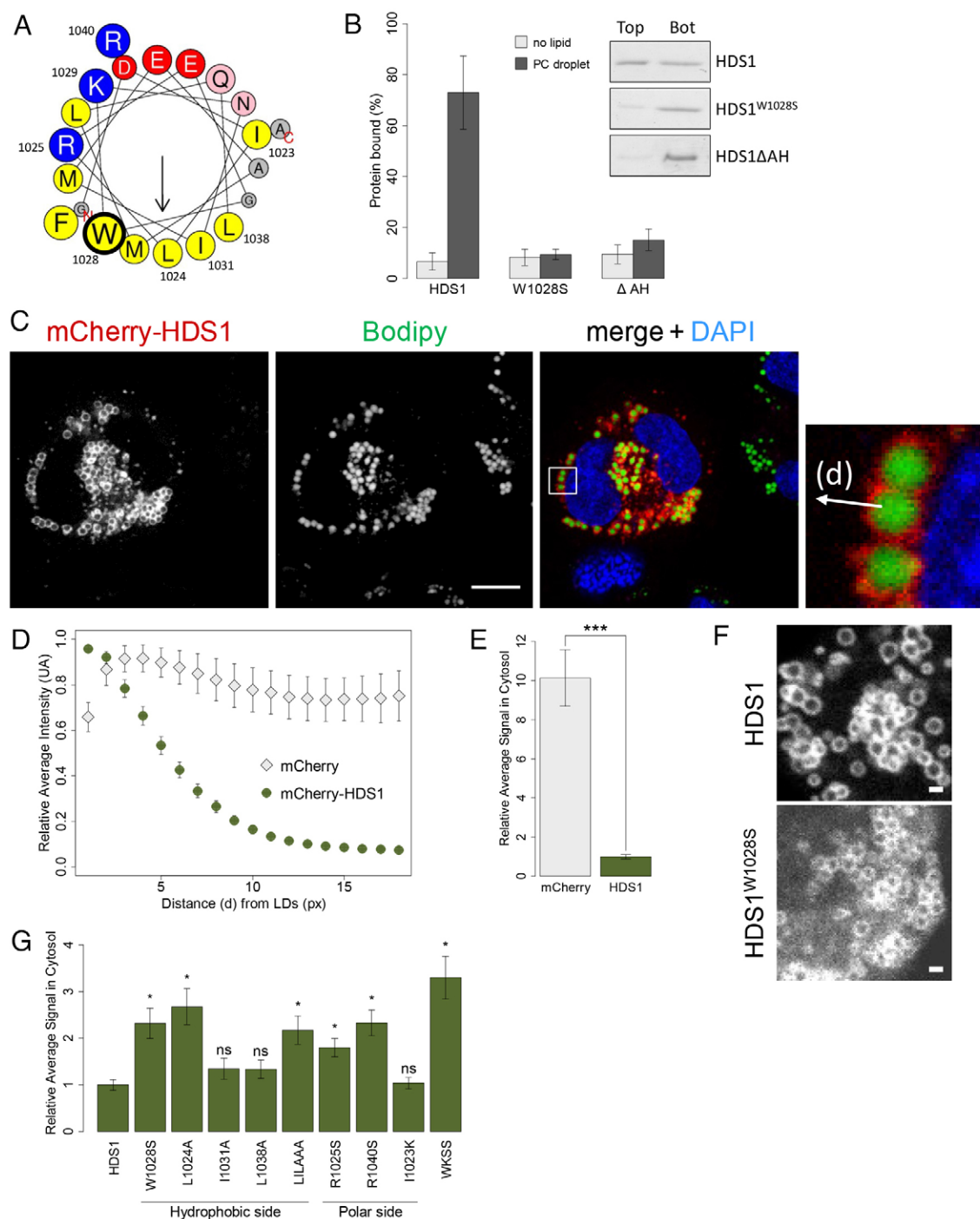


Fig. 3. An amphipathic region in HDS1 is required for HDS1 binding to LDs in cells and *in vitro*. (A) Helical wheel plot of a portion of the predicted C-terminal amphipathic helix (GBF1 1021–1041) (AH) of HDS1, showing the positions of mutated residues. α -helical properties were calculated using Heliquist software (heliquist.ipmc.cnrs.fr). (B) GST–HDS1, GST–HDS1 W1028S or GST–HDS1 Δ AH were incubated with or without artificial PC droplets then sucrose gradient flotations were performed. Percentage protein bound was determined as described in Fig. 2. Values are means \pm standard deviation of at least three independent experiments. (C) HeLa cells expressing mCherry–HDS1 were treated with oleic acid, then fixed and stained with BODIPY to visualize LDs. White arrow in the inset labeled ‘(d)’ is an example of the vector along which quantifications shown in D were obtained. Scale bar: 10 μ m. (D) The LD localization of HDS1 was quantified using Imaris and ImageJ, as described in Materials and Methods. The relative average fluorescence intensity, plotted as a function of distance (d, see part C) from a point near the LD edge, measured in pixels (px). (E) Bar graph representing the average fluorescence intensity at 18 pixels in plots such as those shown in D, normalized against that obtained for wild-type HDS1. Error bars represent the 95% confidence interval. *** $P < 10^{-10}$ (standard *t*-test). (F) Images of HeLa cells expressing mCherry–HDS1 or mCherry–HDS1W1028S treated as in C. Scale bars: 1 μ m. (G) HeLa cells expressing mCherry–HDS1 (wild type or mutants) were treated with oleic acid before being fixed and stained for LD visualization as in C. Quantifications of the association with LDs were performed as described in E. * $P < 10^{-3}$ (standard *t*-test). LILAAA stands for HDS1 L1024A, I1031A, L1038A and WKSS stands for HDS1 W1028S, K1029S.

fusion to produce very large droplets. We tested two phospholipid compositions, either PC alone or Golgi mix liposomes containing 50 mol % PC, above the minimum concentration to stably maintain artificial LDs. Droplets of a relatively uniform size were produced by extrusion. Binding of proteins to artificial LDs was assayed by flotation, and to validate the method we first used different forms of myristoylated Arf1 (myr-Arf1) as a control. Arf1 in its GDP-bound form (myr-Arf1-GDP) is primarily soluble, whereas its GTP-bound form (myr-Arf1-GTP) is tightly membrane bound when binding is assayed on liposomes of a wide range of compositions, including PC alone (Antonny et al., 1997). Proteomics studies have indicated that Arf1-GTP is present on LDs purified from cells induced to form LDs by oleate treatment (Bartz et al., 2007b). When assayed on either pure PC or Golgi mix artificial droplets, myr-Arf1-GDP failed to bind, whereas myr-Arf1-GTP bound as efficiently to these artificial LDs as to liposomes (Fig. 2D). We then tested binding of GST-HDS1, and found that it associated efficiently with artificial droplets, in contrast to GST alone, which was unable to bind (Fig. 2E). There was no significant difference in binding to pure PC or Golgi mix droplets. These results demonstrate that HDS1 is capable of binding to a phospholipid monolayer surface *in vitro*, and that this domain can bind efficiently to artificial LDs containing only neutral phospholipids.

A predicted amphipathic helix in the HDS1 C-terminal region is necessary and sufficient for HDS1 binding to LDs in cells and to artificial droplets *in vitro*

The C-terminal region of HDS1 is predicted to form an extended amphipathic helix (AH) with the characteristics of a lipid-binding AH (supplementary material Fig. S3A). Within this region is a particularly highly conserved tryptophan residue (Bui et al., 2009), on the hydrophobic side of the predicted helix, within a smaller 21-amino-acid region with the best potential to form an AH (Fig. 3A). To determine whether this region affects the lipid-binding properties of HDS1 *in vitro*, we introduced the W1028S mutation and deletion of the 21-amino-acid AH of HDS1 into GST-HDS1 (region shown in Fig. 3A, Δ AH) and purified the proteins from *E. coli*. The HDS1-W1028S mutant failed to bind liposomes, as describe above (Fig. 2C). Both the HDS1-W1028S and Δ AH mutations abolished binding of HDS1 to artificial droplets (Fig. 3B). Hence the C-terminal amphipathic region of HDS1 is essential for binding to artificial droplets *in vitro*.

To test the importance of the amphipathic C-terminal region (Fig. 3A) in binding of HDS1 to LDs in cells (Fig. 3C), we first developed an algorithm to quantify the level of an mCherry-tagged protein associated with BODIPY-labeled LDs in fluorescence images. Fluorescence intensity was determined along a vector from a point within the LD interior at a fixed distance from the edge (to allow quantification of LDs of different sizes), and extending perpendicularly towards the cytosol (Fig. 3C, inset). If the protein is bound to LDs, maximum fluorescence will be found in a narrow region encircling the LD, and the relative fluorescence will decrease with increasing distance from the LD. If the protein is cytosolic, this value will be relatively constant at all points from the LD circumference. Normalized fluorescence values, averaged for all LDs in a cell, were plotted as a function of distance from the LD starting point. Results for cells expressing mCherry-HDS1 or mCherry alone are plotted in Fig. 3D. To simplify comparison of different HDS1 mutants for their capacity to associate with LDs,

levels of protein in the cytosol were quantified. Specifically, the values of each plot at the plateau reached at a distance of 18 pixels (corresponding to $\sim 2 \mu\text{m}$) from the starting point were determined, and normalized against the value obtained for wild-type HDS1. The results obtained for cytosolic mCherry alone compared with wild-type mCherry-HDS1 are shown in Fig. 3E.

To test the idea that the C-terminal amphipathic region of HDS1 forms an AH, we mutated residues that would alter its amphipathic properties, and assayed the localization of the mutant HDS1 domains fused to mCherry. Positions of the residues within this region that were mutated are shown in Fig. 3A. Mutations in hydrophobic residues in the predicted non-polar face of the HDS1 AH (W1028S, L1024A) led to decreased LD association and an increase in the cytosolic pool of the domain (Fig. 3F,G). Interestingly, the L1024A mutation in a leucine residue predicted to be at the center of the proposed amphipathic α -helix (Fig. 3A), had a severe effect on localization of HDS1, whereas mutation of the adjacent leucines to alanines had little effect (Fig. 3G). The triple mutation of three hydrophobic residues on the non-polar face (L1024A, I1031A, L1038A) had the same effect on localization as the single L1024A mutation (Fig. 3G). Mutations in the charged residues of the polar face (R1025 and R1040) of the HDS1 AH also resulted in loss of LD association (Fig. 3G). A double mutant of both the conserved Trp on the hydrophobic side and a Lys residue on the polar side (W1028S, K1029S) had the strongest effect on localization of HDS1 (Fig. 3G). However, mutation of the isoleucine predicted to be at the interfacial region of the AH to a lysine (I1023K) had no significant effect on localization (Fig. 3G). Deletion of a major portion of the predicted amphipathic helix (residues 1021–1041) also reduced LD targeting of HDS1 in cells (supplementary material Fig. S3B). These results support the conclusion that the amphipathic property of this predicted helical region plays a crucial role in LD binding in cells.

Our results have shown that, both *in vivo* and *in vitro*, the C-terminal amphipathic region of the GBF1 HDS1 is required for its binding to LDs. To determine whether this region is sufficient on its own to target LDs, we expressed amino acids 1021–1048 fused to mCherry in cells treated with oleic acid. This predicted amphipathic helix was able, on its own, to localize to LDs (Fig. 4A). Compared with the full-length HDS1 domain, there was a higher level of the C-terminal AH in the cytosol (Fig. 4B), suggesting that it targets less efficiently or is less stably associated with LDs. *In vitro*, the C-terminal amphipathic helical region of HDS1 (amino acids 1005–1048 fused to GST) exhibited a high level of binding both to liposomes of different composition, and to artificial droplets (Fig. 4C). Hence the C-terminal AH of HDS1 is a lipid-binding motif, which can target both a monolayer droplet surface and a lipid bilayer, *in vitro* and in cells.

The catalytic Sec7 domain modulates the lipid-binding domain of HDS1

Our results have shown that the HDS1 domain expressed in oleic-acid-treated cells localizes very efficiently to LDs, with little if any localization to other organelles detectable at steady state. To further understand this localization mechanism, we determined how stably mCherry-HDS1 is associated with LDs by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis. Little if any significant fluorescence recovery was detected up to

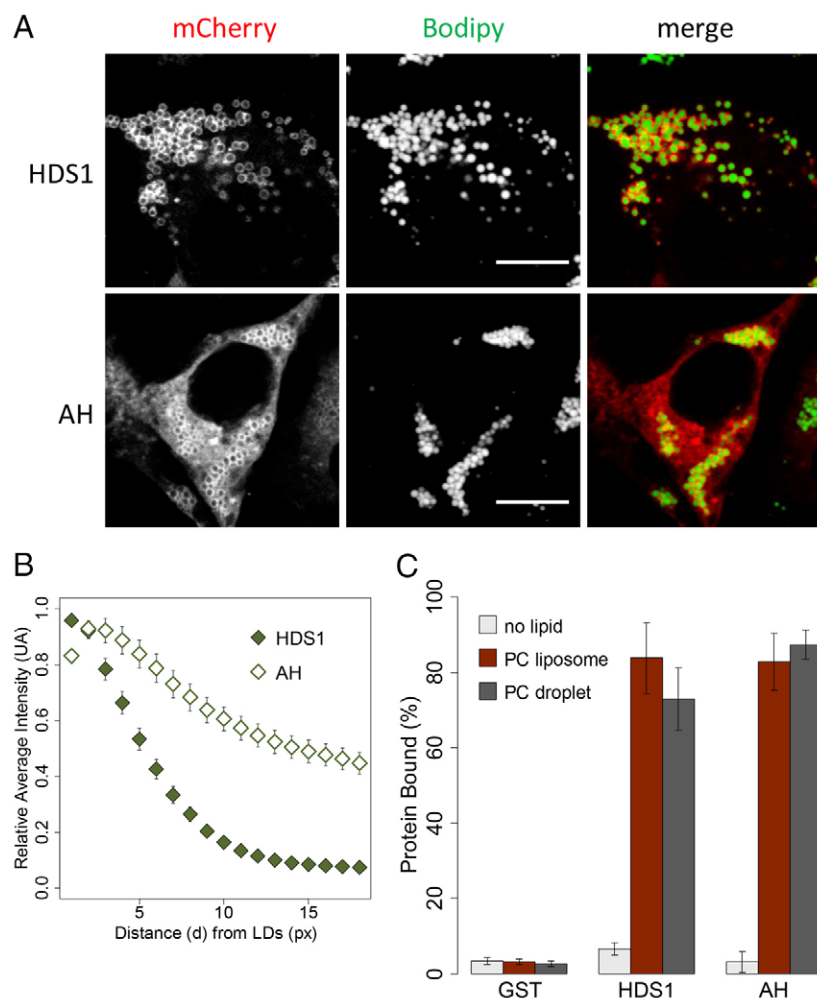


Fig. 4. A C-terminal amphipathic helix within HDS1 targets LDs in cells and artificial droplets *in vitro*.

(A) HeLa cells expressing mCherry–HDS1 or mCherry–AH (GBF1 1021–1048) were treated with oleic acid then fixed and colocalization with LDs monitored by staining with BODIPY. Scale bars: 10 μ m. (B) Localization of mCherry–HDS1 and mCherry–AH (GBF1 11021–1048) quantified as in Fig. 3D. (C) GST, GST–HDS1 or GST–AH (GBF1 1005–1048) were incubated with either PC liposomes, artificial PC droplets or no lipid at 37°C for 30 minutes. For each protein, the percentage of total protein in the top fraction was determined as described in Fig. 2. Values are means \pm standard deviation of at least three independent experiments.

6 minutes after photobleaching of an entire LD, indicating a slow replenishment of the majority of mCherry–HDS1 onto the LD surface (Fig. 5A, quantification shown in Fig. 5B). Hence LD-associated mCherry–HDS1 does not rapidly exchange with other pools within the cell. In cells not treated with oleic acid, HDS1 was found associated both with the few LDs present, and with structures in close proximity to the ER (Fig. 6A and data not shown). Subcellular fractionation indicated that the majority of HDS1 is present in the membrane fraction under these conditions (Fig. 6C). Hence HDS1 is targeted to membrane structures when not associated with LDs.

The fact that once associated with LDs, HDS1 is not readily exchanged, suggests that it might be important for cells to regulate this tight association. Indeed, in contrast to HDS1 alone, only a small fraction of full-length GBF1 is found at LDs in cells treated with oleic acid (Soni et al., 2009), suggesting regulation of its localization. To determine whether other domains of GBF1 are involved in membrane association, we expressed larger fragments of the protein. Strikingly, we found that the Sec7 domain–HDS1 tandem expressed in cells had a predominantly cytosolic localization, both by fluorescence imaging (Fig. 6A,B) and fractionation (Fig. 6C). In addition, the purified Sec7–HDS1 tandem was unable to associate with liposomes *in vitro*, in stark contrast to HDS1 alone (Fig. 6D,E). Hence the Sec7 domain

modulates the lipid-binding capacity of HDS1, inhibiting its ability to bind membranes both *in vitro* and in cells. Because the N-terminal region of yeast Sec7p, including both the Sec7 and HDS1 domains, binds to membranes only in the presence of Arf1 (Richardson et al., 2012), we tested the idea that the presence of the Sec7 domain might now confer a requirement for Arf1 in liposome binding *in vitro*. The Sec7–HDS1 tandem was therefore incubated with liposomes in the presence of myr–Arf1. However, neither the GDP-bound nor the GTP-bound forms of myr–Arf1 increased the level of binding of Sec7–HDS1 to liposomes (Fig. 6E).

Given that the Sec7–HDS1 tandem does not localize to membranes in cells or to liposomes *in vitro*, we were interested in determining which additional domains of GBF1 are required for membrane targeting. The C-terminal regions of GBF1 downstream of HDS2, although they may play a role, are not required for localization to ERGIC–Golgi membranes in cells (supplementary material Fig. S2). Hence all or part of the N-terminal region, containing two homology domains called DCB and HUS, is likely to be important for Golgi localization. Indeed, we found that N-terminal truncations of GBF1 that lacked the DCB domain failed to localize to ERGIC or Golgi structures (supplementary material Fig. S2). We then expressed a construct extending from the HUS domain to the end of the HDS2 domain,

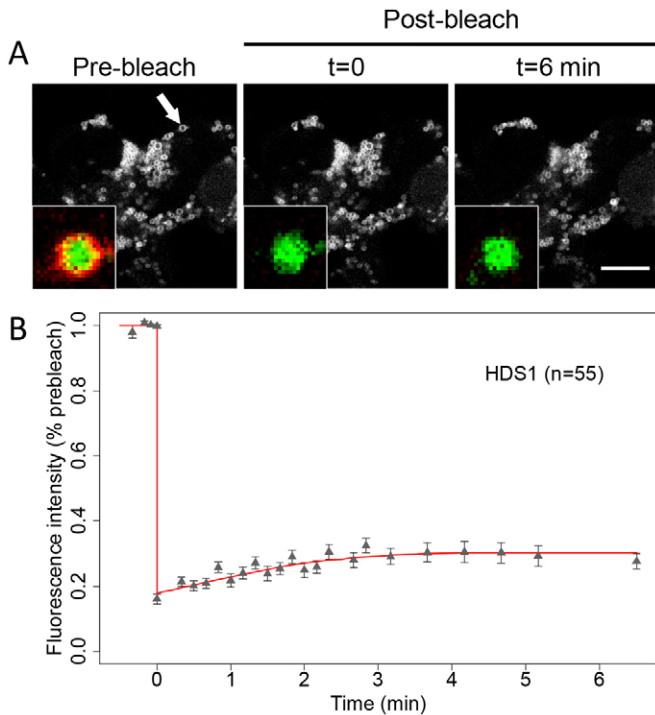


Fig. 5. The GBF1 HDS1 domain is stably associated with LDs. (A) HeLa cells expressing mCherry-HDS1 were treated with 400 μ M oleic acid and incubated for 16–20 hours, then BODIPY was added prior to imaging. FRAP experiments were performed on isolated LDs as described in Materials and Methods. The arrow indicates an LD in which the mCherry signal was photobleached at time 0. Pre-bleach (left), immediately after bleach (middle), and post-bleach (right) images are shown. mCherry fluorescence is shown in the main panels; the insets are overlays of the channels showing the photobleached LD labeled with BODIPY. Scale bar: 10 μ m. (B) Average fluorescence intensity in the red channel corrected for photobleaching is plotted as a function of time. 55 cells in three independent experiments performed as illustrated in A were analyzed. Error bars represent the 95% confidence interval.

encompassing both the catalytic Sec7 and HDS1 domains. This portion of GBF1 was associated with membranes in cells, as determined by fluorescence and fractionation analysis (Fig. 7A,B). However, this construct, like the N-terminal truncations, did not accumulate in the Golgi region, even when cells were treated with BFA (data not shown), although it did fractionate with membranes under these conditions (Fig. 7B). In cells treated with oleic acid, this HUS-to-HDS2 construct localized to LDs, similar to the HDS1 domain alone (Fig. 7A, bottom panels), although with a higher level in the cytosol (Fig. 7A, compare left and right bottom panels). Hence the HUS domain is not sufficient to mediate targeting of the downstream Sec7-HDS1-HDS2 domains to the Golgi, but requires in addition the DCB domain for Golgi localization.

Discussion

We demonstrate here that the peripherally associated regulator GBF1 localizes to lipid droplets (LDs) and to Golgi membranes through the same lipid-binding domain. GBF1, an activator of the Arf1 small G protein, is the first Arf1-GEF to function in the secretory pathway, and also plays an important role in LD metabolism (Donaldson and Jackson, 2011; Walther and Farese,

2012). Two domains of GBF1, HDS1 and HDS2, localize on their own to LDs in cells, whereas the full-length GBF1 protein localizes primarily to membranes of the secretory pathway, even in cells induced to produce LDs by treatment with fatty acids (Ellong et al., 2011; Soni et al., 2009). In this study, we focused on the HDS1 domain, located directly downstream of the catalytic Sec7 domain of GBF1, showing that it is capable of binding both bilayer liposomes and monolayer droplets *in vitro*. We also show that this potent LD-binding capacity of HDS1 is attenuated by the Sec7 domain, because the Sec7 domain-HDS1 tandem is soluble, both *in vitro* and in cells. Further addition of the upstream HUS domain results in a construct that can bind to membranes in cells, but does not accumulate on Golgi or ERGIC membranes at steady state. The full N-terminal region is required for GBF1 to maintain a persistent association with Golgi membranes.

During Golgi maturation, there is sequential activation of Arf1, first by a GBF family member at the *cis*-Golgi, then by a BIG family member at the *trans*-Golgi (Gillingham and Munro, 2007). Fromme and colleagues have proposed that the Arf1-dependent interaction of the Sec7p HDS1 domain is important to restrict binding of this late-acting Arf-GEF to membranes on which Arf1 has already been activated (Richardson et al., 2012). In this context, it is significant that the GBF1 HDS1 domain does not require Arf1 for binding, nor does activated Arf1 enhance binding of the HDS1 domain to liposomes *in vitro*. The Arf1-independent binding of GBF HDS1 and the Arf1-dependent lipid binding of the equivalent domain in BIG/Sec7 will ensure that GBF1 Arf-GEFs are recruited prior to BIG/Sec7 proteins, thus providing directionality in trafficking through the Golgi.

Together with these previous studies, our results support the idea of a general mechanism for binding of the GBF and BIG Arf-GEFs to membranes. For GBF1, both the HDS1 and HDS2 domains are required for GBF1 localization in cells, and the N-terminal region, which has been shown to bind to Rab1 (Monetta et al., 2007), is necessary to target GBF1 to Golgi membranes. Localization of BIG1, a mammalian and *Drosophila* homologue of yeast Sec7p, to late Golgi membranes requires binding of the BIG1 N-terminus to activated Arl1, a marker of the late Golgi (Christis and Munro, 2012). Hence, as for GBF1, both interaction of the HDS1 domain directly with lipids, and interaction of the N-terminus with another small G protein are involved in specific targeting of the BIG/Sec7 Arf-GEFs.

Our *in vitro* data indicate that HDS1, through its C-terminal amphipathic region, is able to efficiently bind to liposomes or artificial droplets containing PC alone. Hence a specific phosphorylated phosphoinositide, other charged lipids, or cholesterol are not required for lipid binding by HDS1, in keeping with the composition of both early Golgi membranes and LDs. Interestingly, a recent study has shown that a larger region of GBF1, including HDS1 and HDS2, as well as a 90-amino-acid region downstream, can target the leading edge of migrating neutrophils through specific recognition of phosphatidylinositol 3-phosphate and other products of phosphoinositide 3-kinase gamma (Mazaki et al., 2012). HDS1 and HDS2 on their own do not bind to phosphatidylinositol 3-phosphate, nor target the leading edge, but require the 90-amino-acid proline-rich region immediately downstream of HDS2 for this targeting. The fascinating picture that emerges is that the HDS1 domain (and probably HDS2 as well) are lipid-binding domains that have the capacity to bind to different membranes in cells, with other

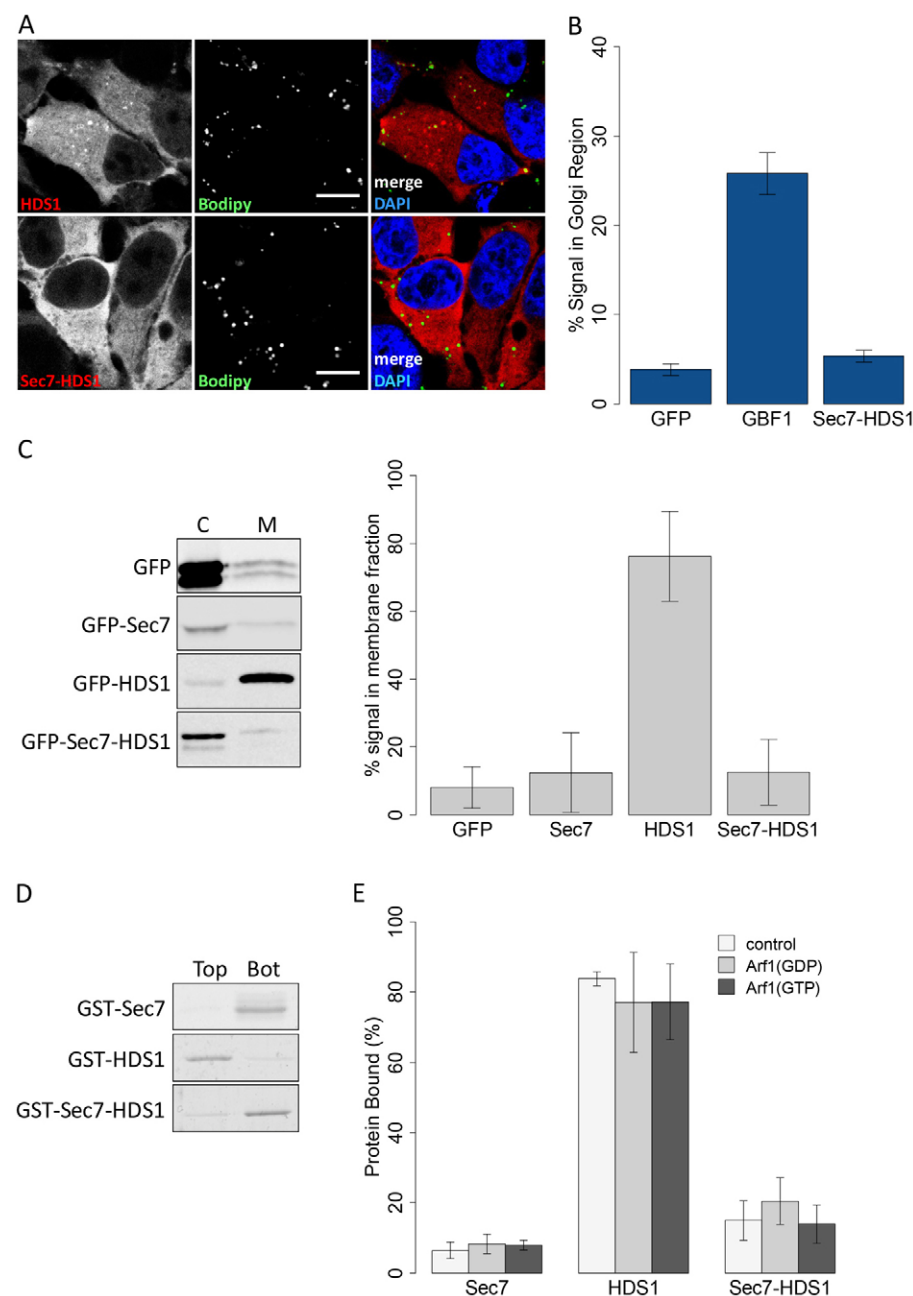


Fig. 6. The catalytic Sec7 domain of GBF1 inhibits membrane localization of HDS1, both in cells and *in vitro*. (A) HeLa cells expressing mCherry-HDS1 or the mCherry-Sec7-HDS1 tandem were fixed and stained to visualize LDs as described in Fig. 3. Scale bars: 10 μ m. (B) HeLa cells expressing GFP, GFP-GBF1 or GFP-Sec7-HDS1 were incubated with 10 μ g/ml BFA for 10 minutes at 37°C then fixed and immunostained for Golgi localization, and the signal within the Golgi region was calculated as described in Materials and Methods. Error bars represent the 95% confidence interval.

(C) Fractionation of HeLa cells (not treated with BFA) expressing GFP, GFP-Sec7, GFP-HDS1 or GFP-Sec7-HDS1 was performed as described in Fig. 1. Representative images of western blots are shown (left panel); the means and standard deviation of at least three experiments were calculated (right panel). C, cytosolic fraction; M, membrane fraction. (D) Flotation assay in which azolectin liposomes were incubated with either GST-HDS1, GST-Sec7 or GST-Sec7-HDS1. (E) Azolectin liposomes were loaded with Myr-Arf1(GDP), with Myr-Arf1(GTP), or not loaded with Myr-Arf1 (control), then incubated with either GST-HDS1, GST-Sec7 or GST-Sec7-HDS1. Percentage protein bound was determined as described in Fig. 2. Values are means \pm standard deviation of at least three independent experiments.

regions of the GBF1 protein conferring specific information that targets the protein either to membranes of the early secretory pathway, LDs of oleic-acid-treated cells or the leading edge of migrating cells. For Golgi targeting of GBF1, protein-protein interactions are probably involved in addition to the protein-lipid interaction we reveal here. For LD localization of either GBF1 or the HDS1 domain alone, we have not ruled out the possibility that protein-protein interactions are involved in targeting. Although the HDS1 domain can localize to liposomes *in vitro* in the absence of additional proteins, we have evidence of interactions with LD-localized proteins that may possibly contribute to targeting (Ellong et al., 2011); coincidence detection mechanisms involving both may operate. Further studies are required to determine whether protein-lipid interactions may be solely responsible for targeting HDS1 to LDs, and by what mechanism.

The C-terminal region of the lipid-binding HDS1 domain of GBF1 is an amphipathic region predicted to form an α -helix on membranes. We have shown here that this region on its own is able to bind to LDs in cells, as well as to droplets *in vitro*, indicating that it is an LD targeting motif. Our mutagenesis analysis of this region supports the conclusion that it forms an amphipathic helix *in vitro* and in cells, and that this property is important for its targeting to LDs. Interestingly, other proteins, including perilipins (Bulankina et al., 2009), hepatitis C virus (HCV) core protein (Boulant et al., 2006), HCV NS5A protein, the antiviral peptide viperin (Hinson and Cresswell, 2009) and CTP:phosphocholine cytidyltransferase α (CCT α) (Krahmer et al., 2011), all have amphipathic helices that are necessary and sufficient for targeting to LDs. Because the LD surface is a phospholipid monolayer, amphipathic helices are ideal

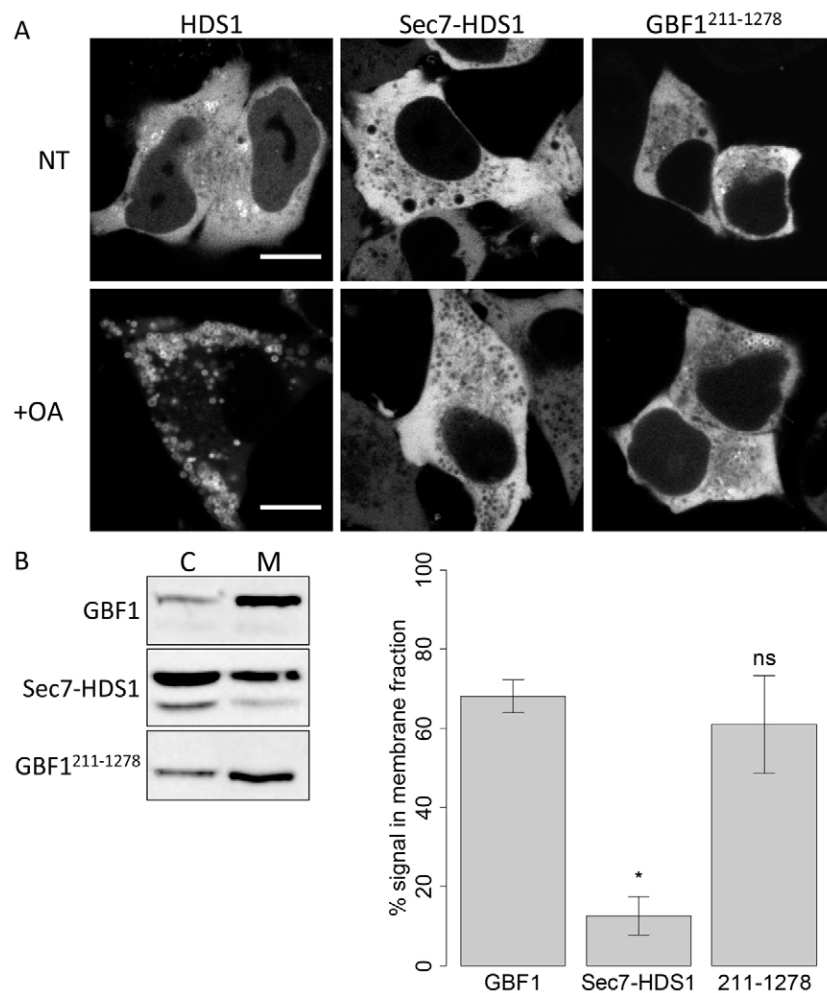


Fig. 7. The N-terminal region of GBF1 is required for maintenance of Golgi localization in cells. (A) HeLa cells expressing Venus-HDS1, GFP-Sec7-HDS1 or Venus-GBF1 211-1278 were treated (+OA) or not (NT) with 400 μ M oleic acid, then imaged by confocal microscopy at 37°C. Scale bars: 10 μ m. (B) HeLa cells expressing the indicated GBF1 construct were treated with BFA before processing for fractionation as described. The image shown is representative of at least two independent transfections. C, cytosolic fraction; M, membrane fraction. Quantification was performed as described in Fig. 1; means \pm standard deviation from at least two independent experiments are shown.

localization devices, as they enter the interfacial region of only a single phospholipid monolayer. Although HDS1 can bind both to bilayer liposomes and droplets surrounded by a phospholipid monolayer *in vitro*, it localizes primarily to LDs in cells, in a stable manner. Other LD-associated proteins that are localized through AHs, including specific perilipins (Wang et al., 2009) and CCT α (Krahmer et al., 2011) are also stably associated with the LD surface. This could be due to either interactions of these AH-containing proteins with other LD resident proteins, or the biophysical properties of the LD phospholipid monolayer surface that lead to a stable association of an AH once it is bound. Interestingly, in addition to AH-containing LD proteins, the enzyme catalyzing the first step in triglyceride biosynthesis, glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 (GPAT4), has been shown to localize both to the ER and to LDs, and once on the LD surface, it does not return to the ER (Wilfling et al., 2013). This property may be a general principle of LD-binding proteins.

Materials and Methods

Plasmids and antibodies

Plasmids used in this study are listed in supplementary material Table S1. All constructs were confirmed by DNA sequencing. HDS1 was cloned into pGEX-4T1 using *Eco*RI and *Sal*I sites; Sec7 and Sec7-HDS1 using *Bam*HI and *Xho*I sites. GBF1 and truncated forms were cloned into *Xho*I and *Kpn*I sites of pVenus-C1 and pmCherry-C1 (generous gifts from George Patterson, NIH, USA). GBF1- Δ HDS1, - Δ HDS2 and - Δ HDS1-2 were derived from pEGFP-GBF1-887Xho (which has a

*Xho*I site after amino acid 887 of GBF1; a kind gift from Y. Mazaki and H. Sabe, Kumamoto, Japan) by PCR amplification of appropriate C-terminal regions of GBF1 and cloning into *Xho*I and *Nor*I sites. The following antibodies were used: mouse anti-GST (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), mouse anti-GFP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), mouse anti-GBF1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), rabbit anti-ERGIC53/p58 (Sigma-Aldrich), mouse anti- β -actin (Abcam, Cambridge, MA, USA), rabbit anti-ATGL (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), guinea pig anti-ADRP (Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany), mouse anti-GM130 (BD Biosciences).

Expression and purification of recombinant proteins in *E. coli*

GST was expressed and purified as described previously (Ellong et al., 2011). Myr-Arf1 was purified from BL21Gold(DE3) cells transformed with pET11d-Arf1 and pBB(NMT) (generous gifts of Bruno Antonny, Sophia Antipolis, France) as described (Franco et al., 1995). GST-HDS1 (wild type, W1028S and Δ AH) were induced in *E. coli* strain C41(DE3) with isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG, Euromedex, Strasbourg, France) at 30°C for 4 hours. GST-Sec7-GBF1 and GST-Sec7-HDS1-GBF1 were induced in *E. coli* strain Rosetta(DE3)pLys with IPTG at 20°C overnight (for GST-Sec7) or at 37°C for 2 hours (for GST-Sec7-HDS1). For HDS1-containing proteins, lysis was carried out in TEX buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) in the presence of Complete Mini Protease Inhibitor cocktail (Roche Diagnostics), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, USB), 0.5% Nonidet P40 substitute (NP40, Sigma-Aldrich) and 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Proteins were purified on a glutathione-Sepharose 4B resin (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) at 4°C and eluted in 15 ml TEX supplemented with 50 mM reduced L-glutathione, 0.5% NP40 and 0.5% Triton X-100, then dialyzed against 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT buffer and concentrated with a Vivaspinn system (Sartorius Stedim, Palaiseau, France). Concentrations were determined with BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific/Pierce Brebières, France).

For GST–Sec7–GBF1, cells from a 1 liter culture were sonicated in 20 ml of buffer A (100 mM sodium phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM DTT) supplemented with 0.5% sodium deoxycholate and Complete Mini Protease Inhibitor cocktail. Cells were centrifuged and the supernatant was loaded on a glutathione–Sepharose 4B column. The resin was washed with buffer A, then with buffer A containing increasing concentration of reduced L-glutathione: 10 mM, 30 mM then 50 mM. Protein eluted in the final two washing steps was dialyzed against 10 mM Tris–HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT buffer, and concentrated with a Vivaspins system.

Liposome and artificial droplet preparation

Azolectin (L-phosphatidylcholine type IV-S) was from Sigma-Aldrich; other lipids were from Avanti Polar Lipids/Coger (Paris, France). Golgi-mix phospholipids contained (mol%) egg PC (50), egg PE (19), brain PS (5), liver PI (10), cholesterol (16), NBD-PE (0.2). For liposome preparation, a dried film was prepared in a glass tube by evaporation of a mixture of the indicated lipids in chloroform (azolectin, Golgi mix or PC only) and resuspended in HK buffer (50 mM HEPES–KOH pH 7.2 and 120 mM potassium acetate). After five freeze–thaw cycles, the liposome suspension was extruded 19 times through polycarbonate filters (pore size of 0.4 µm for defined composition liposomes or 0.1 µm for azolectin liposomes) using a hand extruder (Avanti Polar Lipids) at a final lipid concentration of 20 mg/ml for azolectin liposomes and 1 mM for defined composition liposomes. Liposomes were stored at room temperature and used within 2 days after preparation. Artificial droplets were prepared as described previously (Thiam et al., 2013). Briefly, 70 µl triolein (Sigma-Aldrich) were mixed in a glass tube with 0.5 µmol phospholipids and 1 pmol NBD-PE. Chloroform was evaporated under an argon flow, then under vacuum. The oil was dispersed in 1 ml of HK buffer by vigorous vortexing, then extruded nine times through a 1 µm pore size nitrocellulose membrane. Artificial droplets were stored at room temperature and used the day of the preparation.

Lipid binding assays

For proteins purified in the presence of detergent, Pierce Detergent Removal Spin Columns (Thermo Scientific/Pierce) were used according to manufacturer's instructions. Proteins were incubated with liposomes or artificial droplets in HK buffer containing 1 mM MgCl₂ and 1 mM DTT (HKM buffer) at 37°C for 30 minutes in a total volume of 58 µl. Nucleotide (100 µM of GTP or GDP) was loaded onto Myr-Arf1 in the presence of lipids (liposomes or droplets) and 2 mM EDTA for 30 minutes at 37°C, then 2 mM MgCl₂ was added. The suspension was adjusted to 31.5% sucrose by adding 42 µl of a 75% w/v sucrose solution in HKM buffer, then overlaid with 75 µl HKM buffer containing 25% w/v sucrose, and finally 10 µl HKM buffer. The sample was centrifuged at 55,000 rpm (259,000 g) in a Beckman rotor TLS 55 for 1 hour at 20°C. The bottom (95 µl), middle (75 µl) and top (20 µl) fractions were manually collected from the bottom using a syringe (Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland) and analyzed by SDS–PAGE using Blue Silver Staining (Candiano et al., 2004). Gels were scanned and quantifications performed using ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Except for azolectin liposomes, the recovery of the liposomes/artificial droplets after fraction collection was checked using NBD-PE fluorescence with a FUJI LAS-3000 fluorescence imaging system.

Cell culture and transfection

HeLa and Cos7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 4.5 g/l glucose, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate (GE Healthcare) and 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Retinal pigment epithelial (RPE-1) cells were grown in DMEM/Ham's F12 medium (1:1; PAA, Les Mureaux, France) supplemented with 10% FBS. Subconfluent cells were transfected with plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or FuGENE-6 (Roche Diagnostics). Oleic acid (OA) complexed with BSA was prepared as described previously (Soni et al., 2009). For overnight OA treatment, at 8 hour post-transfection cells were treated with 100–400 µM OA and incubated for an additional 16–20 hours before preparation for imaging. BFA (Sigma-Aldrich) was added to cells at 5–10 µg/ml for 5–10 minutes before preparation for imaging.

Immunofluorescence and microscopy

For immunofluorescence microscopy, HeLa cells were grown on glass coverslips and fixed with 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) at room temperature for 15 minutes. Cells were incubated for 40 minutes to 1 hour in blocking buffer [20 mM glycine, 0.3% BSA, 0.01% saponin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in PBS buffer] at room temperature, and probed with primary antibody for 16 hours at 4°C, then with secondary antibody for 1 hour at room temperature. To stain the LD cores, cells were incubated with 1 µg/ml BODIPY 493/503 (Invitrogen) in PBS for 20 minutes at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides using Prolong Antifade Gold (Invitrogen), sealed and stored at 4°C. Images and z-stack images were acquired using an inverted confocal laser scanning microscope (TCS SP5 AOBS Tandem resonant Scanner, Leica).

The percentage of signal in the Golgi region was determined with the following equation:

$$I_{\text{Golgi}}(\%) = \frac{Int_{\text{Golgi}} - (Avg_{\text{background}} A_{\text{Golgi}})}{Int_{\text{All}} - (Avg_{\text{background}} A_{\text{All}})}, \quad (1)$$

where Int_{Golgi} is the intensity of the signal within the Golgi region automatically segmented with the GM130 signal, $Avg_{\text{background}}$ is the average noise measured in a region outside cell, A_{Golgi} is the area of the Golgi region, Int_{All} is the intensity of the whole image and A_{All} is the area of the image.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments were performed as described previously (Soni et al., 2009). Three pre-bleach images were taken at low laser intensity. Then, the region of interest (ROI) corresponding to one single isolated LD was scanned three times with the appropriate laser line at full laser power to photobleach mCherry fluorescence. Fluorescence recovery into the ROI was monitored immediately after the bleach by time-lapse imaging at low-intensity illumination. The values were plotted using the following equation:

$$I_{\text{cell}}(t) = \left(\frac{I_{\text{ROI}}(t)}{I_{\text{ROI}}(t_0)} \right) \left(\frac{I_{\text{cell}}(t)}{I_{\text{cell}}(t_0)} \right) 100, \quad (2)$$

where $I_{\text{cell}}(t_0)$ is the prebleach whole cell intensity, $I_{\text{cell}}(t)$ is the whole cell intensity at time t , $I_{\text{ROI}}(t_0)$ is the intensity in the bleached ROI before the bleach, and $I_{\text{ROI}}(t)$ is the intensity in the bleached ROI at time t . For each quantification, the number of cells imaged, from at least three independent transfections, is indicated (n).

Quantification of protein distribution around LDs

Image processing algorithms were developed to quantify the intensity of the signal as a function of the distance to LD volume using Imaris 7.6 (Bitplane) and ImageJ. All images were processed with the same parameters. LD size and position were determined first with the Imaris Spots detection tool using the region growing option on the green channel which correspond to the LD core stained with BODIPY 493/503. An image of isolated LD positions was then generated and exported to ImageJ in order to identify pixels which were inside the cell and outside LDs in the red channel (pmCherry fusion proteins). These pixels were obtained using filtering and mathematical morphology in the following way: an exact Euclidean distance transformation in 3D was first performed from the image of isolated LD positions to create a new image where the values of the intensities of pixels were equal to the distance from the center of LD previously obtained. Successive thresholds of this distance map were performed in order to create a mask for each distance from LDs. These masks were used to select pixels and were quantified in the red channel. Another mask corresponding to borders of the cell was obtained by filtering (median filter) and thresholding with a low level in the red channel. Finally, the average signal in the red channel of the pixels included in the mask of the cell was calculated for each distance to the center of LDs. The average signal was normalized against the maximum value and plotted against the distance to LDs to generate an intensity profile of the red channel signal along the cross section of LDs.

Subcellular fractionation

Cells were incubated with 10 µg/ml BFA for 10 minutes at 37°C, then washed with ice-cold PBS, scraped from plates and centrifuged at 1500 g for 5 minutes at 4°C. Approximately 1.5×10^6 cells were used for each condition. Cell pellets were resuspended in 200 µl of 50 mM HEPES–KOH pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, supplemented with protease inhibitors (GE Healthcare), by five passages through a 26-gauge needle on ice and disrupted by five passages through a 30-gauge needle on ice. Cell lysates were centrifuged at 5000 g for 10 minutes at 4°C, and 100 µl of the post-nuclear supernatant were centrifuged at 100,000 g for 50 minutes at 4°C using a Beckman swing rotor (TLS-55). Two fractions, cytosol (supernatant) and membranes (pellet), were collected. The membrane fraction was resuspended in 50 µl homogenization buffer supplemented with 1% Triton X-100, 1% NP40 and 0.1% SDS (Invitrogen). Equivalent volumes of the two fractions were then analyzed by SDS–PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with an antibody against GFP. Images were acquired using a FUJI LAS-3000 fluorescence imaging system and quantification of at least three independent experiments was performed using ImageJ. The percentage of membrane-bound protein was calculated with the following equation:

$$\%_{\text{membrane}} = \frac{Den_{[M]}}{Den_{[M]} + 2(Den_{[C]})}, \quad (3)$$

where $Den_{[M]}$ is the density of the membrane fraction band and $Den_{[C]}$ is the density of the cytosolic fraction band.

Acknowledgements

We thank Ting Niu, George Patterson, Yuichi Mazaki, Hisataka Sabe and Bruno Antonny for plasmids. We are grateful to Bruno Antonny

for communication of the artificial droplet assay, and to Ting Niu for preliminary GBF1 localization results.

Author contributions

C.L.J. and S.B. conceived the project and designed experiments. S.B. and M.P.G. designed and performed experiments. V.C. developed the LD protein association algorithm. C.L.J. and S.B. wrote the manuscript.

Funding

This work was funded by grants from the Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR2010-BLAN-1229-01 to C.L.J.]; the Fondation pour la Recherche Médicale [grant number INE20071110975 to C.L.J.]; the Centre National de la Recherche Scientifique, France and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche [grant number 2010/7 to S.B.].

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.134254/-/DC1>

References

- Antony, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. and Chabre, M. (1997). N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**, 4675-4684.
- Bartz, R., Li, W. H., Venables, B., Zehmer, J. K., Roth, M. R., Welti, R., Anderson, R. G., Liu, P. and Chapman, K. D. (2007a). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* **48**, 837-847.
- Bartz, R., Zehmer, J. K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y. and Liu, P. (2007b). Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J. Proteome Res.* **6**, 3256-3265.
- Beck, R., Rawet, M., Wieland, F. T. and Cassel, D. (2009). The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett.* **583**, 2701-2709.
- Behnia, R. and Munro, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**, 597-604.
- Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jäckle, H., Auld, D. S. and Oliver, B. (2008). COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol.* **6**, e292.
- Bigay, J. and Antony, B. (2012). Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev. Cell* **23**, 886-895.
- Bigay, J., Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B. and Antony, B. (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* **24**, 2244-2253.
- Bonifacino, J. S. and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 409-414.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratniner, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J. P., Penin, F. and McLauchlan, J. (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* **281**, 22236-22247.
- Bozza, P. T. and Viola, J. P. (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **82**, 243-250.
- Bui, Q. T., Golinelli-Cohen, M. P. and Jackson, C. L. (2009). Large Arf1 guanine nucleotide exchange factors: evolution, domain structure, and roles in membrane trafficking and human disease. *Mol. Genet. Genomics* **282**, 329-350.
- Bulankina, A. V., Deggerich, A., Wenzel, D., Mutenda, K., Wittmann, J. G., Rudolph, M. G., Burger, K. N. and Hönig, S. (2009). TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J. Cell Biol.* **185**, 641-655.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327-1333.
- Christis, C. and Munro, S. (2012). The small G protein Arf1 directs the trans-Golgi-specific targeting of the Arf1 exchange factors BIG1 and BIG2. *J. Cell Biol.* **196**, 327-335.
- Cohen, J. C., Horton, J. D. and Hobbs, H. H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* **332**, 1519-1523.
- Donaldson, J. G. and Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 362-375.
- Ellong, E. N., Soni, K. G., Bui, Q. T., Sougrat, R., Golinelli-Cohen, M. P. and Jackson, C. L. (2011). Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the Arf1 activator GBF1. *PLoS ONE* **6**, e21889.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. and Paris, S. (1995). Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J. Biol. Chem.* **270**, 1337-1341.
- García-Mata, R., Szul, T., Alvarez, C. and Sztul, E. (2003). ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2250-2261.
- Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Viswanatha, R., Antosh, A. L., Brown, W. J., Kohlwein, S. D. and Henry, S. A. (2008). A block in endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking inhibits phospholipid synthesis and induces neutral lipid accumulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 25735-25751.
- Gaspar, M. L., Hofbauer, H. F., Kohlwein, S. D. and Henry, S. A. (2011). Coordination of storage lipid synthesis and membrane biogenesis: evidence for cross-talk between triacylglycerol metabolism and phosphatidylinositol synthesis. *J. Biol. Chem.* **286**, 1696-1708.
- Gillingham, A. K. and Munro, S. (2007). The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 579-611.
- Greenberg, A. S., Coleman, R. A., Kraemer, F. B., McManaman, J. L., Obin, M. S., Puri, V., Yan, Q. W., Miyoshi, H. and Mashek, D. G. (2011). The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 2102-2110.
- Guo, Y., Walther, T. C., Rao, M., Sturman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J. S., Vale, R. D., Walter, P. and Farese, R. V. (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* **453**, 657-661.
- Hinson, E. R. and Cresswell, P. (2009). The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20452-20457.
- Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H. W., Schmidt-Supprian, M., Vance, D. E., Mann, M. et al. (2011). Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Cell Metab.* **14**, 504-515.
- Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D. I., Zhu, M. and Anderson, R. G. (2004). Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J. Biol. Chem.* **279**, 3787-3792.
- Mazaki, Y., Nishimura, Y. and Sabe, H. (2012). GBF1 bears a novel phosphatidylinositol-phosphate binding module, BP3K, to link PI3K activity with Arf1 activation involved in GPCR-mediated neutrophil chemotaxis and superoxide production. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2457-2467.
- Monetta, P., Slavin, I., Romero, N. and Alvarez, C. (2007). Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2400-2410.
- Niu, T. K., Pfeifer, A. C., Lippincott-Schwartz, J. and Jackson, C. L. (2005). Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1213-1222.
- Panic, B., Whyte, J. R. and Munro, S. (2003). The ARF-like GTPases Arl1p and Arl3p act in a pathway that interacts with vesicle-tethering factors at the Golgi apparatus. *Curr. Biol.* **13**, 405-410.
- Richardson, B. C., McDonald, C. M. and Fromme, J. C. (2012). The Sec7 Arf-GEF is recruited to the trans-Golgi network by positive feedback. *Dev. Cell* **22**, 799-810.
- Saka, H. A. and Valdivia, R. (2012). Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 411-437.
- Soni, K. G., Mardones, G. A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C. L. and Bonifacino, J. S. (2009). Coatomer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J. Cell Sci.* **122**, 1834-1841.
- Stehr, M., Elamin, A. A. and Singh, M. (2012). Cytosolic lipid inclusions formed during infection by viral and bacterial pathogens. *Microbes Infect.* **14**, 1227-1237.
- Szul, T., García-Mata, R., Brandon, E., Shestopal, S., Alvarez, C. and Sztul, E. (2005). Dissection of membrane dynamics of the ARF-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic* **6**, 374-385.
- Thiam, A.-R., Antony, B., Wang, J., Delacotte, J., Wilfling, F., Walther, T. C., Beck, R., Rothman, J. E. and Pincet, F. (2013). COPI buds 60-nm lipid droplets from reconstituted water-phospholipid-triacylglyceride interfaces, suggesting a tension clamp function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [Epub ahead of print].
- Vamparys, L., Gautier, R., Vanni, S., Bennett, W. F., Tieleman, D. P., Antony, B., Etchebest, C. and Fuchs, P. F. (2013). Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys. J.* **104**, 585-593.
- Vanni, S., Vamparys, L., Gautier, R., Drin, G., Etchebest, C., Fuchs, P. F. and Antony, B. (2013). Amphipathic lipid packing sensor motifs: probing bilayer defects with hydrophobic residues. *Biophys. J.* **104**, 575-584.
- Walther, T. C. and Farese, R. V., Jr (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 687-714.
- Wang, H., Hu, L., Dalen, K., Dorward, H., Marcinkiewicz, A., Russell, D., Gong, D., Londos, C., Yamaguchi, T., Holm, C. et al. (2009). Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J. Biol. Chem.* **284**, 32116-32125.
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Krahmer, N., Gould, T. J., Uchida, A., Cheng, J. X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F. et al. (2013). Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets. *Dev. Cell* **24**, 384-399.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A. and Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS—lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* **15**, 279-291.
- Zhao, X., Claude, A., Chun, J., Shields, D. J., Presley, J. F. and Melançon, P. (2006). GBF1, a cis-Golgi and VTCs-localized ARF-GEF, is implicated in ER-to-Golgi protein traffic. *J. Cell Sci.* **119**, 3743-3753.

SUPPLEMENTARY MATERIAL for

Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes

by Samuel Bouvet, Marie-Pierre Golinelli-Cohen, Vincent Contremoulins, and Catherine L. Jackson

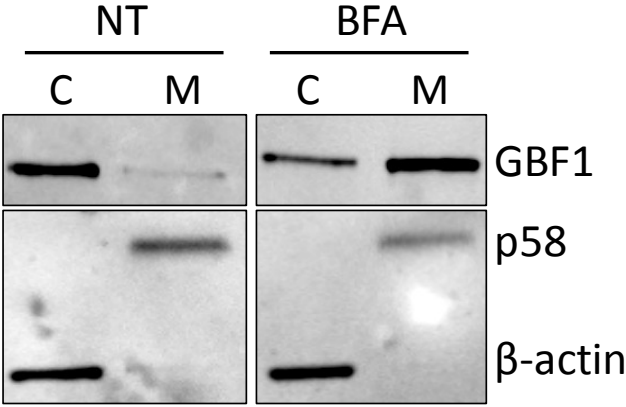
Files in this Data Supplement:

* Supplementary Figures S1, S2, S3

* Supplementary Table S1

Figure S1

A



B

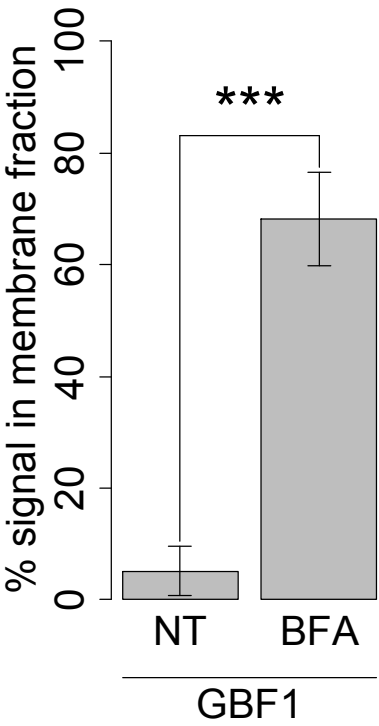


Figure S2

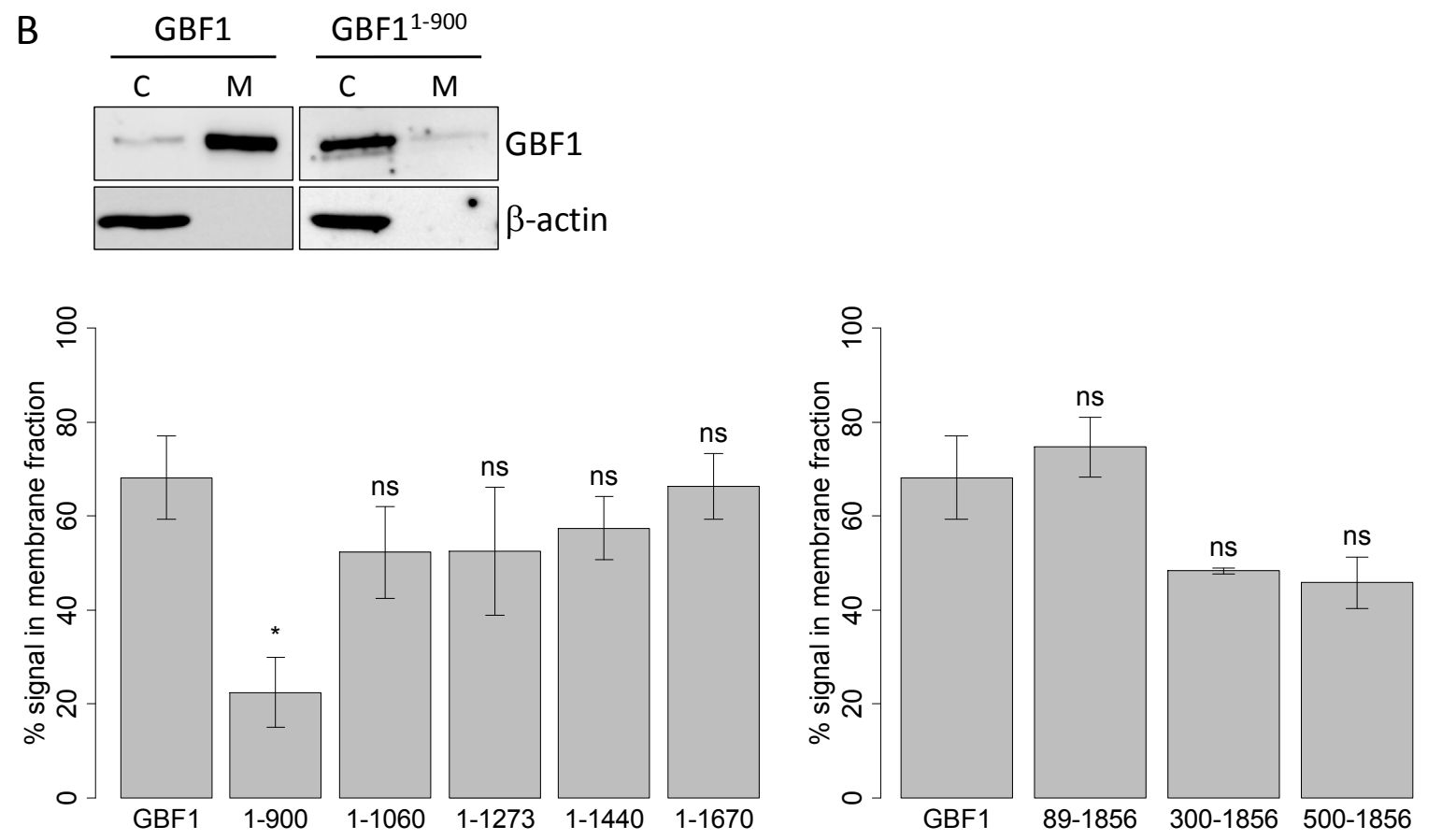
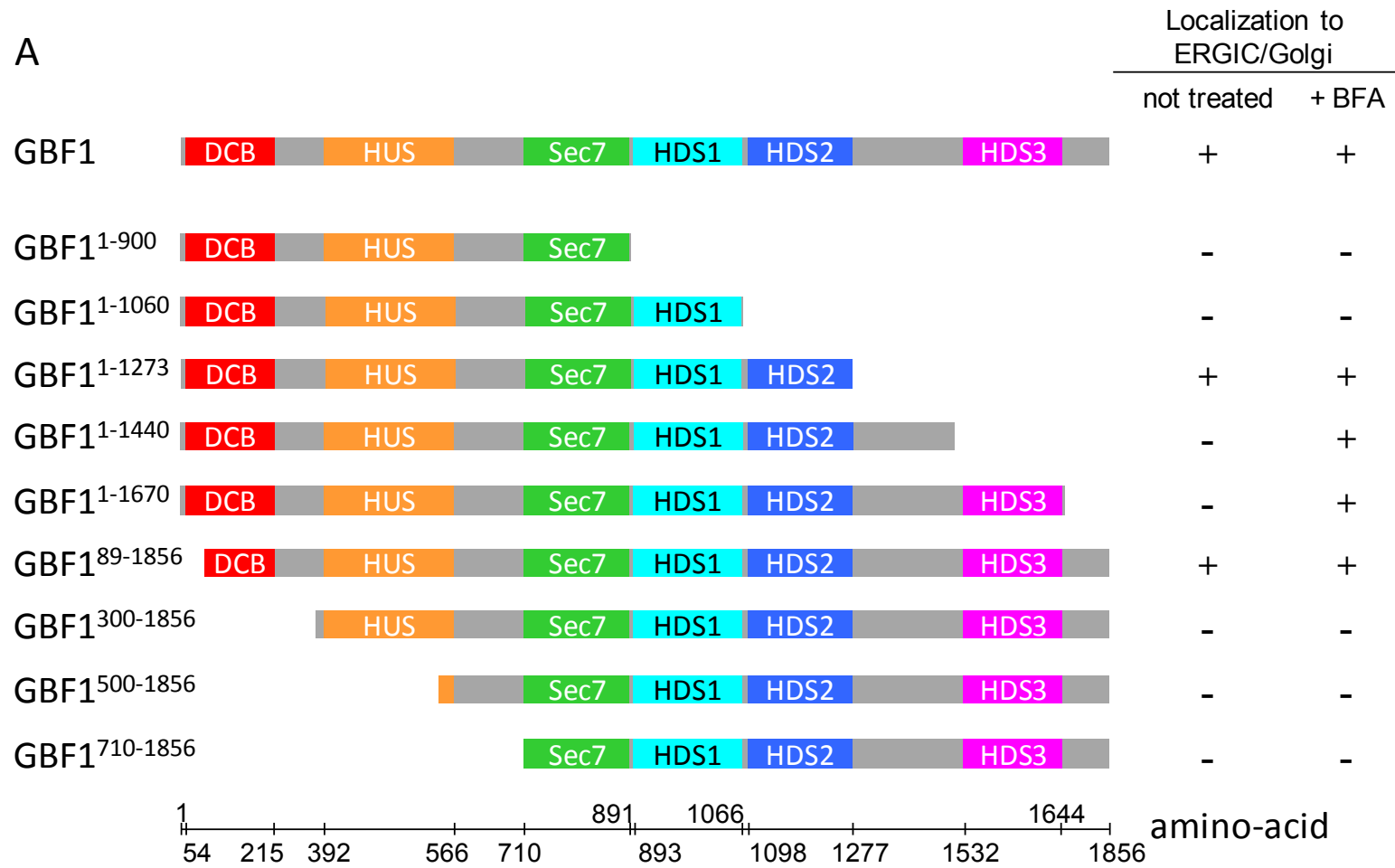
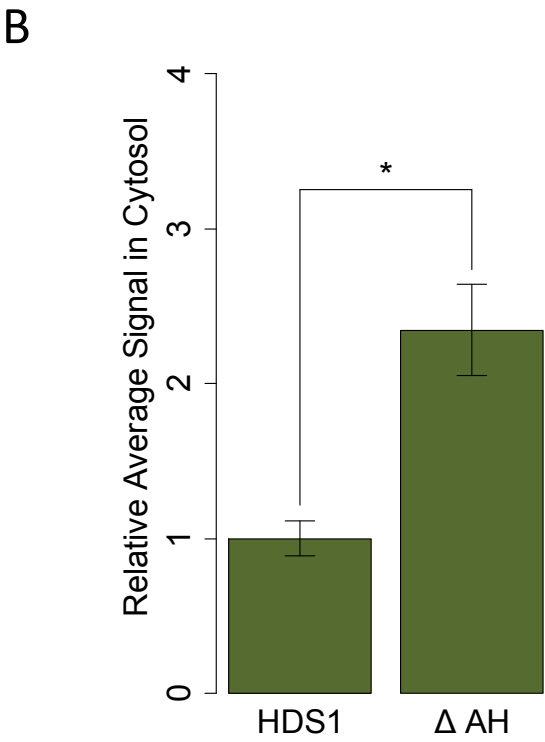
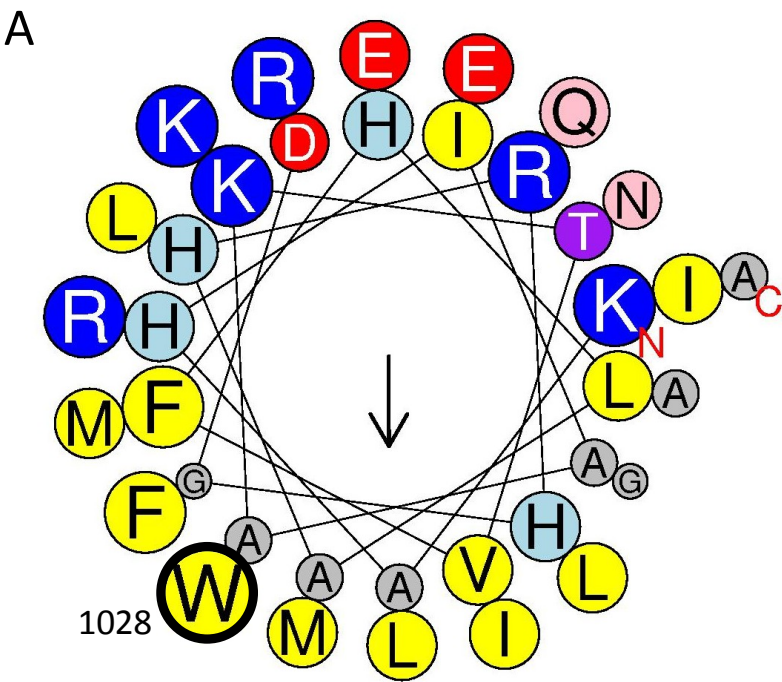


Figure S3



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1: BFA treatment stabilizes the association of overexpressed GFP-GBF1 with membranes.

(A) HeLa cells expressing GFP-GBF1 were incubated with 10 $\mu\text{g/mL}$ BFA or DMSO (NT) for 10 min at 37°C before fractionation analysis. Blot shown is representative of 4 independent experiments. C: cytosolic fraction. M: membrane fraction. β -actin: marker of cytosolic fraction. p58: marker of membrane fraction; **(B)** Band density was quantified using Image J software (NIH) and the amount of membrane bound protein was calculated as described in Materials and Methods. Error bars represent the 95% confidence interval. ***p-value $<10^{-6}$ (Standard t-test).

Figure S2: Both the C-terminus and the N-terminus of GBF1 are required for localization to ERGIC and Golgi membranes in cells.

(A) HeLa, RPE-1 and/or Cos7 cells expressing the indicated pVenus-GBF1 construction were treated with BFA (+BFA) or DMSO diluent alone (not treated) after overnight incubation and live cell imaging was performed. The Golgi/ERGIC localization (+) is defined as an accumulation of signal in the perinuclear region whereas the cytoplasmic localization (-) corresponds to a diffuse signal throughout the cell; **(B)** Fractionation of cells expressing the indicated GFP-GBF1 construct after treatment with 10 $\mu\text{g/mL}$ BFA for 10 min. Blot shown is representative of 3 independent experiments. C: cytosolic fraction. M: membrane fraction. β -actin: marker of cytosolic fraction. Quantifications shown in the bottom panel were performed as described in Figure 1. Error bars represent the 95% confidence interval. * p-value < 0.001 (Standard Student t-test).

Figure S3: The C-terminal amphipathic region of HDS1 and effects of mutations within this region on HDS1 lipid binding.

(A) Helical wheel plot of the predicted C-terminal amphipathic region of HDS1 (GBF1 amino acids 1005-1041) showing the conserved tryptophan (W1028). Calculations of α -helical properties were performed using the Heliquist prediction software (heliquist.ipmc.cnrs.fr/); **(B)** HeLa cells expressing mCherry-HDS1 wild type or with the deletion of the AH shown in Figure 3A, the C-terminal portion of the region shown in part (A) (GBF1 amino acids 1021-1041) were treated with oleic acid before fixing and staining with BODIPY to visualize LDs as described in Figure 3. Quantifications of the association with LDs were performed as described in Materials and Methods. *p-value $<10^{-3}$ (Standard t-test).

Supplemental Table S1. Plasmids used in this study

Plasmid	Expressed protein	Reference
pTKN101	Venus-GBF1(1-1856) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pVenus-N-GBF1	Venus-GBF1(1-900) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pVenus-GBF1-1060	Venus-GBF1(1-1060) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pVenus-GBF1-1273	Venus-GBF1(1-1273) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pVenus-GBF1-1440	Venus-GBF1(1-1440) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pVenus-GBF1-1670	Venus-GBF1(1-1670) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pTKN265	Venus-GBF1(89-1856) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pTKN900	Venus-GBF1(300-1856) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pTKN1500	Venus-GBF1(500-1856) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pVenus-HDS1-GBF1	Venus-GBF1(900-1067) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pVenus-HDS2-GBF1	Venus-GBF1(1067-1278) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pVenus-C-GBF1	Venus-GBF1(710-1856) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson Laboratory
pVenus-GBF1-HUStoHDS2	Venus-GBF1(211-1278) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pEGFP-GBF1ΔHDS1	GFP-GBF1 with aa 887-1066 deleted (<i>H. sapiens</i>)	This study
pEGFP-GBF1ΔHDS2	GFP-GBF1 with aa 1068-1278 deleted (<i>H. sapiens</i>)	This study
pEGFP-GBF1ΔHDS1-2	GFP-GBF1 with aa 887-1278 deleted (<i>H. sapiens</i>)	This study
pEGFP-GBF1ΔAH	GFP-GBF1 with aa 1021-1041 deleted (<i>H. sapiens</i>)	This study
pEGFP-GBF1-Sec7-HDS1	GFP-GBF1(710-1066) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pEYFP-Sec7-GBF1	YFP-GBF1(710-894) (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pEYFP-GBF1ΔSec7	YFP-GBF1 with aa 710-900 deleted (<i>H. sapiens</i>)	Jackson laboratory
pEGFP-GBF1-AH	GFP-GBF1(1021-1048) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pVenus-GBF1-AH	Venus-GBF1(1021-1048) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-C1	mCherry	George Patterson ^a
pmCherry-HDS1-GBF1	mCherry-GBF1(911-1066) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-I1023K	mCherry-GBF1(911-1066) with the I1023K mutation (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-L1024A	mCherry-GBF1(911-1066) with the L1024A mutation (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-R1025S	mCherry-GBF1(911-1066) with the R1025S mutation (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-W1028S	mCherry-GBF1(911-1066) with the W1028S mutation (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-I1031A	mCherry-GBF1(911-1066) with the I1031A mutation (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-L1038A	mCherry-GBF1(911-1066) with the L1038A mutation (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-R1040S	mCherry-GBF1(911-1066) with the R1040S mutation (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-R1025S-W1028S	mCherry-GBF1(911-1066) with the R1025S and W1028S mutations (<i>H. sapiens</i>)	This study

pmCherry-HDS1-GBF1-W1028S-K1029S	mCherry-GBF1(911-1066) with the W1028S and K1029S mutations (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-HDS1-GBF1-AAA	mCherry-GBF1(911-1066) with the L1024A, I1031A and L1038A mutations (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-GBF1-AH	mCherry-GBF1(1021-1048) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pmCherry-Sec7-HDS1-GBF1	mCherry-GBF1(710-1066) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pGEX-4T1-Sec7-GBF1	GST-GBF1(689-895) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pGEX-4T1-Sec7-HDS1	GST-GBF1(695-1066) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pGEX-4T1-HDS1-GBF1	GST-GBF1(911-1066) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pGEX-4T1-HDS1-W1028S-GBF1	GST-GBF1(911-1066) with the W1028S mutation (<i>H. sapiens</i>)	This study
pGEX-4T1-HDS1 Δ AH - GBF1	GST-GBF1(911-1066) with aa 1021-1041 deleted (<i>H. sapiens</i>)	This study
pGEX-4T1-AH-GBF1	GST-GBF1(1005-1048) (<i>H. sapiens</i>)	This study
pET11d-Arf1	Arf1 (<i>Bos taurus</i>)	Bruno Antonny ^b
pBB(NMT)	N-myristoyltransferase (<i>S. cerevisiae</i>)	Bruno Antonny ^b

^a National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, NIH, USA

^b CNRS-Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Sophia Antipolis, France

La cellule eucaryote compartimentalise ses tâches au sein d'organelles communiquant les unes avec les autres au moyen de vésicules de transport. Le trafic vésiculaire est contrôlé par des petites protéines G de la superfamille Ras, activées par un changement de nucléotide guanidique catalysé par un facteur d'échange (GEF). En particulier, au niveau du *cis*-Golgi la petite protéine G Arf1 est activée par le facteur d'échange GBF1, permettant le transport rétrograde des vésicules COPI vers le réticulum endoplasmique. Récemment, GBF1 a été impliqué dans d'autres fonctions, notamment dans le cycle réplicatif de certains virus ou dans le métabolisme des gouttelettes lipidiques.

Les gouttelettes lipidiques sont les organelles ubiquitaires du stockage des lipides et ont un rôle majeur dans l'homéostasie des lipides à l'échelle de la cellule. Le trafic intracellulaire des ces organelles dynamiques serait contrôlé par des petites protéines G. Notre équipe a montré dans une précédente étude que GBF1 est localisé sur les gouttelettes lipidiques et est impliqué dans le recrutement de PLIN2 et de la lipase ATGL sur les gouttelettes lipidiques.

Cette thèse montre, grâce à des études de biologie cellulaire et de microscopie, que GBF1 possède un domaine de fixation aux phospholipides *via* une hélice amphipatique. Cette hélice est nécessaire et suffisante pour l'association aux gouttelettes lipidiques *in cellulo*. La régulation de la localisation de GBF1 repose sur l'interaction avec Rab1B (cascade entre Rab1 et Arf1 dans la voie sécrétoire précoce) ainsi que sur les interactions intramoléculaires entre les différents domaines de GBF1.

The eukaryotic cell physically separates its functions within several membrane-bound organelles, which communicate using vesicles. Vesicular trafficking is under the control of small GTPases that exist as an inactive GDP-bound form and an active GTP-bound form. The switch between GDP and GTP is catalyzed by a guanine nucleotide exchange factor (GEF). On *cis*-Golgi membranes, Arf1, activated by the large GEF GBF1, recruits the COPI coat. COPI coated vesicles ensure the retrograde transport from the Golgi to the ER. Recently, GBF1 has been implicated in other pathways, such as the life cycle of various viruses and lipid droplet metabolism.

Lipid droplets (LD), the major lipid storage organelle, play a major role in lipid homeostasis within the cell. LDs are connected to membrane trafficking and are therefore under the control of GTPases. In previous studies, our team showed that GBF1 localizes around LDs and that it is required for protein loading onto the LD surface.

Here, data support the idea that GBF1 localizes to the LD surface. Using cell biology tools and microscopy, we identified, within GBF1, a lipid binding domain. In this domain, a single amphipathic helix is necessary and sufficient for LD targeting in cells. The regulation of GBF1 localization relies on interaction with Rab1 (data support a Rab1-Arf1 cascade between the ER and the Golgi) and on intramolecular interactions between GBF1 domains.